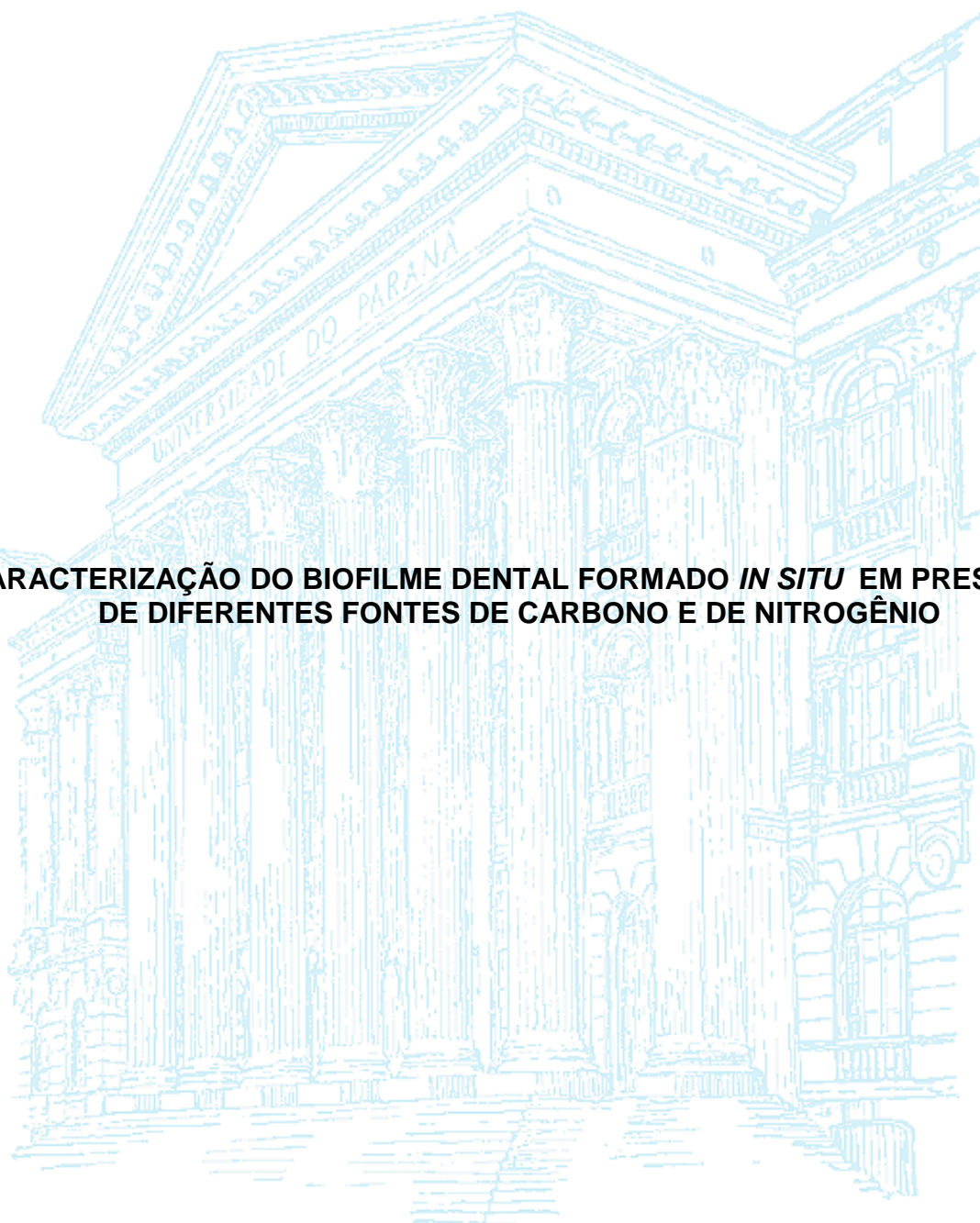


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEANDRO ROBERTO WOJCIK

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DENTAL FORMADO *IN SITU* EM PRESENÇA  
DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO**



CURITIBA  
2009

LEANDRO ROBERTO WOJCIK

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DENTAL FORMADO *IN SITU* EM PRESENÇA  
DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Machado Benelli

CURITIBA  
2009

## TERMO DE APROVAÇÃO

LEANDRO ROBERTO WOJCIK

### CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DENTAL FORMADO *IN SITU* EM PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine Machado Benelli (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Jaime Paba Martinez

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Bonatto

Departamento de Genética - UFPR



Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz

Departamento de Estomatologia - UFPR

Curitiba, 19 de fevereiro de 2009.

*“...Quem me vê sempre parado, distante, garante que eu não sei sambar/  
Tô me guardando pra quando o carnaval chegar...”*  
(Chico Buarque de Holanda)

*À Jeny Tulio Wojcik  
dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, por ter me ofertado a chance de desenvolver um trabalho, em prol do avanço da minha área de atuação;

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Machado Benelli, pela orientação, pelos conhecimentos passados e pela dedicação;

Aos Prof.<sup>os</sup> Gláucia Martinez, Élide Pereira dos Santos (Depto. de Botânica), Fábio de Oliveira Pedrosa e Emanuel M. de Souza, por disponibilizarem laboratórios, materiais e equipamentos de importância fundamental para o desenvolvimento deste trabalho;

Em especial ao Prof.<sup>o</sup> João Armando Brancher, já que pelas suas aulas ministradas e pela amizade incondicional, durante e após a graduação, me incentivaram a trilhar este caminho e chegar até aqui;

À Prof.<sup>a</sup> Cecília F. da G. Ferreira (“Grande Cecília”) do Pipe (Engenharia e Ciências dos Materiais), com o seu auxílio presencial nas inúmeras datas marcadas de AFM (faça chuva, faça sol) e nos conhecimentos difundidos, de extrema valia para que este trabalho fosse realizado;

Aos meus amigos Karin Noga e Rogério de Oliveira Sombrio Jr, que mais do que colegas de profissão, são amigos que favoreceram e favorecem o engrandecimento deste trabalho e da Odontologia;

Ao meu amigo e camarada Hugo Leonardo Crocetti que, com sua ajuda de extrema valia no escaneamento de géis e afins, auxiliou no cumprimento deste trabalho;

Ao Valter e a Dona Rose pela atenção, tempo disponível e equipamentos que contribuíram (e muito) para que este trabalho tivesse êxito;

Às colegas de laboratório Magda E. G. Portugal, Patrícia Castellen e às “meninas” da iniciação científica que, direta ou indiretamente, tem colaboração na realização deste trabalho;

Aos colegas e amigos Anelis, “Mano”Arquimedes, Carol (“Ê, Mulher”), Dirce, Larry e Tuca que, com suas conversas, idéias e personalidades me acrescentaram, e muito, como ser humano, dentro e fora da Bioquímica;

À minha mãe Sueli, minha tia Célia e meus primos Diego e Thiago, família pequena e fundamental presente em todas as horas;

A Deus;

Ao CNPq.

A todas as pessoas citadas e aos que estão no “caderno de memória”, meu sincero muito obrigado.

## RESUMO

A cavidade bucal é um ambiente favorável para o estabelecimento e crescimento de microrganismos que colonizam as superfícies dentais formando o biofilme dental. O biofilme dental é formado por uma ou mais comunidades de microrganismos organizados estrutural e funcionalmente. Em hospedeiros saudáveis, a composição deste biofilme permanece relativamente estável, entretanto, este equilíbrio pode ser rompido por mudanças ambientais que podem desencadear doenças como a cárie e a doença periodontal. Indivíduos com uma dieta rica em carboidratos fermentáveis, especialmente a sacarose, apresentam maior susceptibilidade à cárie dental. A metabolização destes nutrientes acidifica o pH do biofilme, favorecendo a seleção de microrganismos acidogênicos e acidúricos, como: *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.* Em contrapartida, pacientes com insuficiência renal crônica são menos susceptíveis à cárie, apesar de apresentarem uma dieta rica em carboidratos. Estes resultados sugerem que os altos níveis de compostos nitrogenados presentes na saliva destes indivíduos interferem no potencial cariogênico destes biofilmes. Este projeto visou caracterizar a estrutura, o perfil protéico e determinar a quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* presentes no biofilme dental formado *in situ* sobre o esmalte dental bovino, em presença de diferentes fontes de carbono e/ou nitrogênio. A estrutura dos biofilmes foi avaliada por Microscopia de Força Atômica (MFA). As imagens obtidas mostraram que apenas os biofilmes formados em presença de amônia e sacarose isoladamente são semelhantes entre si. Nas demais condições experimentais o padrão morfológico e rugosidade superficial média total dos biofilmes foram diferentes. Já o perfil protéico dos biofilmes formados em diferentes condições foi distinto, sugerindo que, dependendo da condição ambiental, a expressão gênica é regulada diferenciadamente. Entretanto, nem sempre as alterações moleculares podem ser visualizadas a nível estrutural. A quantidade de *S. mutans* nas diferentes condições foram superiores a de *Lactobacillus*. Como ambas as espécies foram encontradas nos diferentes tratamentos, estes microrganismos sobrevivem e podem adaptar-se a estas diferentes condições ambientais. Assim, este trabalho contribuiu para avaliar as mudanças do comportamento do biofilme dental frente a diferentes condições nutricionais disponíveis no ambiente bucal para futura compreensão dos fatores que favorecem as alterações da biodiversidade bacteriana do biofilme dental.

Palavras-chave: Biofilme dental; Fontes de nitrogênio; Perfil protéico.

## ABSTRACT

The oral cavity is a favourable environment for the establishment and growth of microorganisms that colonize the dental surfaces leading to the formation of biofilm. The dental biofilm consists of one or more bacterial species, structurally and functionally organised. In a healthy host, the biofilm composition remains relatively stable, however, this balance can be broken by environmental changes that can lead to caries and/or periodontal disease. Individuals with a diet rich in fermentable carbohydrates, especially sucrose, are more susceptible to develop decay. The metabolism of these nutrients decreases the pH of the biofilm, thereby selecting acidogenic and aciduric microorganisms such as *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp.* that will produce further acids and thus cause dental demineralisation. In contrast, individuals with chronic renal failure are less susceptible to develop decay, despite of a carbohydrate rich diet. These results suggest that high levels of nitrogen compounds in the saliva of these individuals interfere with the cariogenic potential of these biofilms. The aim of the project was to characterise the structure, the protein profile and determine the amount of *S. mutans* and *Lactobacillus spp.* in the dental biofilm. The biofilm was formed *in situ* over bovine enamel in the presence of different carbon and/or nitrogen sources. The AFM images showed that only in the presence of ammonium and sucrose isolated, the biofilm structures were similar. In the other experimental conditions the morphological pattern and the roughness total average were different. The intracellular protein profile of these biofilms, formed under different conditions, was dissimilar, suggesting that the gene expression is distinctly regulated. However, these molecular changes were not always reflected at the structural level. The *S. mutans* colonization in the different experimental conditions was higher than observed for *Lactobacillus spp.* As both species were found in all treatments, these microorganisms seem to be able to survive and adapt to the different environmental conditions. This work contributes to the evaluation of the influence of different nutrients in the oral environment on the biofilm formation and the understanding of the factors, which interfere in the biodiversity changes of the dental biofilm.

Key words: Dental biofilm; Nitrogen sources; Protein profile.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 FORMAÇÃO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA .....	3
2.2 BIOFILME DENTAL .....	5
2.2.1 Aspectos gerais .....	5
2.2.2 Início da Colonização da Superfície Dental .....	7
2.2.3 Mecanismo de adesão das bactérias à película dental adquirida .....	9
2.2.4 Mudança das condições ambientais do biofilme dental .....	12
2.2.5 Co-agregação e sucessão bacteriana .....	12
2.2.6 Relação do <i>S. mutans</i> e o biofilme dental cariogênico .....	16
2.2.7 Metabolismo de N <sub>2</sub> no biofilme dental .....	22
3. OBJETIVOS .....	25
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	26
4.2. PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE DENTAL BOVINO .....	26
4.3. DISPOSITIVO INTRA-BUCAL .....	27
4.4. FORMAÇÃO DO BIOFILME DENTAL .....	28
4.5. CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DE SUPERFÍCIE DO BIOFILME DENTAL .....	28
4.6. CONTAGEM DE MICROORGANISMOS PRESENTES NO BIOFILME DENTAL .....	30
4.6.1 Meios de cultura .....	30
4.7. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	31
4.7.1 Extração das proteínas da matriz extracelular do biofilme .....	31
4.7.2 Extração das proteínas da matriz intracelular do biofilme .....	32
4.7.3 Determinação do perfil protéico formado <i>in situ</i> .....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1. ESTRUTURA DO BIOFILME FORMADO EM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES .....	33

5.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS PRESENTES NO BIOFILME DENTAL .....	38
5.3 COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS DA MATRIZ INTRACELULAR DO BIOFILME FORMADO <i>in situ</i> SOBRE DIFERENTES CONDIÇÕES .....	42
6 CONCLUSÕES .....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISPOSITIVO INTRA-BUCAL PALATINO. ....	27
FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE FUNCIONAMENTO DO MFA. ....	29
FIGURA 3 – IMAGEM TOPOGRÁFICA DOS BIOFILMES FORMADOS SOBRE OS BLOCOS DE ESMALTE EM DIFERENTES CONDIÇÕES .....	35
FIGURA 4 – RUGOSIDADE MÉDIA TOTAL DOS BIOFILMES FORMADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	37
FIGURA 5 – GEL SDS-PAGE 12,5% DE PROTEÍNAS DA MATRIZ INTRACELULAR DO BIOFILME DENTAL FORMADO EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS.....	43

## LISTA DE TABELAS

QUADRO 1 – ADESINAS BACTERIANAS QUE MEDIAM A LIGAÇÃO INICIAL DAS MACROMOLÉCULAS À PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA .....	10
QUADRO 2 – ADESINAS QUE REGULAM A CO-AGREGAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES BACTERIANAS.....	13
TABELA 1 – TAMANHO DAS ESTRUTURAS E FORMAS ENCONTRADAS NOS BIOFILMES FORMADOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS .....	36
TABELA 2 – DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE UFCS DE <i>S. mutans</i> E <i>Lactobacillus spp.</i> NOS BIOFILMES FORMADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES..	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro

g/L – gramas por litro

kDa - kilodaltons

min – minuto

MGA – mucinas de baixo peso molecular

MFA – microscopia de força atômica

mL – mililitro

mm – milímetros

mM – milimol

oC – graus celsius

PECs – polissacarídeos extracelulares

PICs – polissacarídeos intracelulares

PRPs – proteínas ricas em prolina

SDS – dodecil sulfato de sódio

UFC/mL<sup>-1</sup> – unidades formadoras de colônia por mililitro elevado a -1

V – volts

## 1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal, constituída por tecidos moles e duros, faz parte do sistema digestório e é constantemente banhada pela saliva (FEJERSKOV, 2005). A saliva total é constituída de macromoléculas, microrganismos, nutrientes, sais e água (NIEUW AMERONGEN; VEERMAN, 2002). As macromoléculas salivares, especialmente as proteínas e as glicoproteínas, aderem seletivamente às superfícies bucais, sejam elas moles ou duras, formando um filme denominado película dental adquirida (LINDHE, 2005).

As macromoléculas constituintes desta película dental adquirida, quando aderidas às superfícies dentais, expõem sítios de ligação que são reconhecidos por receptores das superfícies das bactérias bucais, determinando quais as espécies microbianas (microrganismos pioneiros) irão iniciar a colonização das superfícies dentais, formando o biofilme (LAMONT; ROSAN, 2000). Em seguida, bactérias colonizadoras tardias irão co-agregar ao biofilme reconhecendo receptores presentes nas superfícies dos colonizadores iniciais (GARCÍA-GODOY; HICKS, 2008).

A princípio, o biofilme bucal forma-se naturalmente nos dentes e age como uma defesa do hospedeiro prevenindo a colonização por microrganismos exógenos, frequentemente patogênicos (JENKINSON; LAMONT, 2005). A composição do biofilme pode permanecer estável até que uma mudança no meio-ambiente bucal local, como o aumento do consumo de carboidratos fermentáveis, aumente o metabolismo fermentativo do biofilme produzindo ácidos que resultam na diminuição do pH do biofilme (THOMAS; NAKAIASHI, 2006). Assim, microrganismos acidúricos, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* irão prevalecer no biofilme dental e favorecerão o aumento da produção de ácidos e desmineralização da superfície dental (cárie dental) (VAN HOUTE, 1993). Em presença de sacarose, *S. mutans* produz polissacarídeos extras (PECs) e intracelulares (PICs) (YOSHIDA *et al.*, 2006). Os PECs favorecem a adesão destes microrganismos à superfície dental e servem como fontes de energia durante períodos de escassez (CISAR; RUHL; SANDBERG, 2004). Este microrganismo também possui proteínas na superfície da membrana externa denominadas adesinas, que auxiliam no processo de adesão ao biofilme (ROGERS, 2001).

Vários estudos correlacionam o aumento no consumo de carboidratos fermentáveis e aumento da susceptibilidade à cárie dental (PAES LEME *et al.*, 2006). Entretanto, pacientes com insuficiência renal crônica que apresentam altos níveis de compostos nitrogenados, como uréia na saliva, e ingerem altas quantidades de carboidratos fermentáveis, apresentam menor susceptibilidade a cárie dental, apesar de apresentarem baixo fluxo salivar (NOWAISER *et al.*, 2003). Este fato pode ser parcialmente explicado pela hidrólise da uréia à amônia pelos microrganismos urease-positivos, que conduz a elevação do pH no biofilme (BOTS *et al.*, 2006). Estas evidências sugerem que o excesso de compostos nitrogenados na cavidade bucal interfere com o processo de formação de biofilme. Entretanto, poucos estudos foram realizados para investigar o metabolismo de nitrogênio no biofilme dental. Assim, este trabalho foi realizado para analisar a morfologia, a composição bacteriana e o perfil protéico do biofilme formado *in situ*, na presença de diferentes fontes de carbono e/ou de nitrogênio.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FORMAÇÃO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA

A cavidade bucal faz parte do sistema digestório e é constantemente banhada pela saliva. A saliva total é um líquido viscoso formado pela mistura de secreções das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e das numerosas glândulas menores (labial, bucal, glossopalatina, palatina e lingual) (MARSH, 2003; FEJERSKOV; KIDD, 2005; HANNIG, M.; JOINER, 2006). Cada tipo de glândula salivar secreta um espectro característico de proteínas (GENCO; GOLDMAN; COHEN, 1999; MARSH, 2003; NIEUW AMERONGEN; VEERMAN 2004; FEJERSKOV; KIDD, 2005; DICKINSON; MANN, 2006). Além do fluido glandular, a saliva total é composta por constituintes não salivares derivados do fluido crevicular gengival, secreções brônquio-expectorantes (muco da cavidade nasal e da faringe), soro sanguíneo e de células sanguíneas de ferimentos bucais, assim como de bactérias e produtos bacterianos, vírus e fungos, células epiteliais descamadas e restos de alimentos, bebidas e alimentos líquidos (fluidos transitórios) (KAUFMAN; LAMSTER, 2000; FEJERSKOV; KIDD, 2005). A saliva lubrifica a mucosa contribuindo para a formação do bolo alimentar, deglutição, fala, primeiras etapas de digestão de carboidratos devido a presença da  $\alpha$ -amilase, a sensibilidade gustativa, a proteção das mucosas contra a penetração de diversas substâncias e na regulação do pH e na ecologia bucal (JORGE, 1996; BENEDETTO, 2002; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

As macromoléculas da saliva, especialmente as proteínas e as glicoproteínas, aderem seletivamente às superfícies bucais formando uma fina camada de material orgânico acelular denominada película dental adquirida (JORGE, 1995; GENCO; GOLDMAN; COHEN, 1999; FEJERSKOV; KIDD, 2005). A película forma-se sobre as superfícies dentais, como o esmalte e o cemento, sobre as mucosas, epitélio bucal queratinizado e não queratinizado, aparelhos ortodônticos, próteses e restaurações (JORGE, 1996; GENCO; GOLDMAN; COHEN, 1999; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A película adquirida dental é composta de macromoléculas provenientes da saliva, como:  $\alpha$ -amilase, lisozima, anidrases carbônicas, glucosiltransferases e



frutossiltransferases, que são imobilizadas na conformação ativa da camada de película formada *in vivo* ou *in situ*. As proteínas plasmáticas, tais como albumina, Ig/G, fibrinogênio e fibronectina, moléculas derivadas do epitélio (como a calgrunalina B e as citoqueratinas), proteínas fosforiladas (proteínas ricas em prolina (PRPs), estaterinas e histatinas), moléculas de glucose e lipídios (lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios) também são encontradas na película dental adquirida (CARLÉN *et al.*, 2003; HANNIG, C. *et al.*, 2005; HANNIG, M.; JOINER, 2006).

A composição da película dental adquirida varia de acordo com a superfície bucal analisada. Dependendo da localização e a proximidade dos ductos das glândulas salivares, esta película dental adquirida apresentará componentes típicos da secreção salivar predominante nesta região (CARLÉN *et al.*, 1998, CARLÉN *et al.*, 2001; JENKINSON; LAMONT, 2005). As propriedades físico-químicas da superfície dental exposta à película dental adquirida também são importantes à formação deste filme e, posteriormente, para o desenvolvimento dos biofilmes bucais. A rugosidade superficial do cimento de ionômero de vidro não polido expõe elementos inorgânicos carregados positivamente, que favorecem uma maior adesão de proteínas e glicoproteínas à esta superfície, aumentando a adesão bacteriana e o acúmulo de biofilme dental. Já em materiais estéticos restauradores, como a resina composta, acontece uma maior adesão bacteriana em superfícies polidas (CARLÉN *et al.*, 2001).

A formação da película acontece em duas fases. Na primeira fase é formada a película jovem, que é caracterizada pela adsorção instantânea de proteínas salivares precursoras da película na superfície do esmalte. Em contato com os eletrólitos da saliva os íons cálcio da hidroxiapatita apresentam maior solubilidade que os íons fosfato. Assim, a superfície do esmalte adquire carga negativa devido a permanência dos íons fosfato. Esta superfície pode ser coberta por uma camada carregada positivamente de íons cálcio neutralizadores distribuídos irregularmente e as proteínas salivares poderão aderir tanto as cargas negativas dos fosfatos quanto as positivas do cálcio (YAO *et al.*, 2001; FEJERSKOV; KIDD, 2005; HANNIG, M.; JOINER; 2006; HARA, LUSSI & ZERO, 2006). Na segunda fase é formada a película dental adquirida madura. Esta película é menos densa e mais frouxa que a inicial e é formada lentamente. Esta fase pode ser considerada como um processo independente, no qual agregados protéicos ou estruturas tipo micelas adsorvem aos sítios descobertos no dente ou interagem com a camada hidrofóbica de proteínas

inicialmente formada (HANNIG, M.; 1999; DICKINSON; MANN, 2006; HARA; LUSSI; ZERO, 2006). A formação destes complexos heterotípicos permitiria que proteínas salivares ou não-salivares, que não têm afinidade com a hidroxiapatita, sejam incorporadas na película adquirida do esmalte. Estes complexos funcionam como um reservatório para as proteínas precursoras da película e as protege da degradação proteolítica (YAO; LAMKIN; OPPENHEIM; 1999; HANNIG, M.; JOINER, 2006).

A película adquirida mantém uma espessura relativamente fina e protege o esmalte contra a abrasão e o atrito e funciona como uma barreira de permeabilidade seletiva que regula o processo de des/remineralização (GENCO; GOLDMAN; COHEN, 1999; FEJERSKOV; KIDD, 2005). Os componentes salivares adsorvidos à superfície dental que formam a película dental adquirida também determinam quais as espécies microbianas que colonizarão as superfícies dentais. As biomoléculas presentes na película adquirida expõem sítios de ligação que interagem com microrganismos específicos, iniciando a formação do biofilme dental (GIBBONS; VAN ROUTE, 1973).

## 2.2 BIOFILME DENTAL

### 2.2.1 Aspectos gerais

A formação da película dental adquirida favorece a adesão reversível da célula bacteriana, através de ligações físico-químicas fracas que ocorrem entre a superfície bacteriana e as proteínas e glicoproteínas da película. Após a adesão, ocorre o crescimento bacteriano que leva à formação de microcolônias distintas, a sucessão bacteriana que promove a co-agregação de células bacterianas (colonizadores secundários) aos microrganismos já aderidos, o estabelecimento da comunidade clímax/placa madura e, em situação de saúde bucal, o descolamento deste biofilme (FEJERSKOV; KIDD, 2005; MARSH, 2006).

O biofilme dental, assim como outros biofilmes que colonizam ambientes úmidos, consiste de um filme organizado estrutural e funcionalmente, com uma ou mais comunidades de microrganismos embebidos em uma matriz de

polissacarídeos, proteínas e DNA, secretadas pelas bactérias ou pelo próprio hospedeiro (SUTHERLAND, 2001; WHITCHURCH *et al.*, 2002; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). Estas macromoléculas fixam-se às superfícies sólidas da cavidade bucal, como superfícies dentárias, materiais restauradores, componentes dos implantes e próteses (SCANNAPIECO, 1994; LINDHE, 2005). As bactérias presentes no biofilme exibem um fenótipo alterado com relação à taxa de crescimento e transcrição gênica (DONLAN; COSTERTON, 2002). Em situação de saúde do hospedeiro, a composição do biofilme dental permanece relativamente estável. Como os demais biofilmes, os biofilmes dentais são naturais e contribuem para o desenvolvimento normal da fisiologia e às defesas do organismo (MARSH, 2006).

A princípio, o biofilme bucal forma-se naturalmente sobre os dentes e age como uma das defesas do hospedeiro prevenindo a colonização por microorganismos exógenos, freqüentemente patogênicos. A relação biofilme-hospedeiro é sofisticada sendo que tanto as bactérias patogênicas quanto as bactérias mutualísticas coexistem em homeostase. O desenvolvimento e sustentação do biofilme dental são favorecidos quando as forças interativas entre os organismos e a superfície dental são suficientemente fortes para resistir às forças de cisalhamento (KOLENBRANDER *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004). A homeostase microbiana é atingida devido ao equilíbrio dinâmico entre os microrganismos residentes e as condições ambientais (MARSH *et al.*, 2000; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Apesar de haver uma transferência contínua de organismos entre diferentes regiões do organismo, a composição da microbiota residente do corpo humano é distinta para diferentes habitats, como: na pele, intestino e cavidade bucal (ALEXANDER, 1971; TANNOCK, 1995; MARSH *et al.*, 1989; citado por MARSH, 2003). A maioria das bactérias só consegue sobreviver por longos períodos em um nicho do hospedeiro mediante a formação de biofilmes em superfícies não-descamantes, ou seja, de materiais ou tecidos duros (LINDHE, 2005). A cavidade bucal é semelhante a outras cavidades recobertas por mucosas, entretanto não é um ambiente homogêneo para a colonização bacteriana. Na cavidade bucal a adesão bacteriana é favorecida pela existência de microhabitats, como os dentes, que consistem em superfícies rígidas não-uniformes, com reduzida ou nula renovação superficial e inúmeras regiões distintas, que apresentam diferentes

condições de crescimento favorecendo a colonização de um grupo específico de bactérias (LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996; FEJERSKOV; KIDD, 2005; TEN CATE, 2006).

A homeostase bacteriana no biofilme dental pode ser rompida por mudanças ambientais que podem desencadear em doenças como a cárie e a doença periodontal.

### 2.2.2 Início da colonização da superfície dental

Biofilmes bucais apresentam, no total, cerca de 1000 espécies, metade destas sendo cultiváveis, com suas densidades celulares podendo chegar a  $10^{11}$  UFC/mL<sup>-1</sup> (TEN CATE, 2006; KRETH *et al.*, 2008). Quando o feto encontra-se *in utero*, a boca é usualmente estéril e ao nascimento, a cavidade bucal do neonato entra em contato com numerosos e variados tipos de microrganismos, de fontes ambientais externas variadas (água, ar, comida e seres humanos). Estes microrganismos são transitórios, sendo a principal transmissão feita pela saliva (LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A boca é um ambiente aeróbico e ao mesmo tempo amigável e hostil para os microrganismos. Na maior parte do tempo, há escassez de nutrientes, mas pode haver também períodos repentinos e irregulares de excessos de alimentos, preferencialmente carboidratos. A saliva desempenha um importante papel na regulação do crescimento e na atividade metabólica da microbiota bucal, mantendo o pH em torno de 6,75-7,25, a temperatura em torno de 35-36°C – ideal para muitos microorganismos – além de ser uma fonte primária de glicoproteínas e proteínas para o crescimento bacteriano (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

No início da colonização bacteriana, poucas bactérias são capazes de fixar-se fortemente à superfície dental. Entretanto, os organismos precisam aderir firmemente à superfície para evitar a sua lavagem pela saliva e deglutição. Assim, a maioria dos microrganismos é encontrada em áreas protegidas ou de estagnação ao redor da dentição (FEJERSKOV; KIDD, 2005; LINDHE, 2005).

A colonização inicial da superfície dos dentes pelas bactérias ocorre na infância, logo após a erupção dos incisivos inferiores decíduos. Os microrganismos são transmitidos principalmente através da mãe (transmissão vertical), com a

predominância de bactérias gram-positivas, espécies pioneiras, tais como estreptococos do grupo Viridans (especialmente *Streptococcus gordonii*), *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* biovar tipo 1 e *Actinomyces viscosus* (LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996; KOLENBRANDER *et al.*, 2002; MUNRO; GRAP, 2004; FEJERSKOV; KIDD, 2005). A erupção da dentição decídua cria novos habitats para a colonização microbiana já que os dentes são superfícies não renováveis (descamativas). Assim, a microbiota residente pode aderir, resultando no acúmulo de uma grande massa de bactérias, especialmente em locais de estagnação (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Após 2h e 6h de formação de biofilme, *Actinomyces spp.*, *S. oralis* e *S. mitis*, respectivamente, são as espécies prevalentes em biofilmes de indivíduos saudáveis (LI *et al.*, 2004).

A adesão de bactérias à superfície dental é favorecida pela quantidade de microorganismos presentes na saliva e a sua afinidade pelos receptores complementares presentes na superfície dental (SCANNAPIECO, 1994). Os colonizadores iniciais modificam o ambiente para a ligação das bactérias subseqüentes (colonizadores tardios ou secundários). Portanto, os colonizadores primários constituem uma peça chave na sucessão bacteriana que ocorre nos biofilmes dentais e que irá determinar um quadro de saúde bucal ou de doença (LI *et al.*, 2004).

Mais de 60% das bactérias encontradas nas comunidades iniciais presentes no esmalte dental coberto de saliva são estreptococos (FEJERSKOV; KIDD, 2005; NYVAD; & KILIAN, 1987, citado por JENKINSON; LAMONT, 2005). As bactérias anaeróbicas facultativas gram-negativas como *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.* e microrganismos anaeróbicos restritos gram-negativos como *Prevotella spp.* e *Veillonella spp.* podem também ser colonizadores iniciais (KOLENBRANDER *et al.*, 2002). Microrganismos anaeróbicos restritos gram-negativos, tais como *Porphyromona gingivallis* e até mesmo espiroquetas foram encontrados colonizando as superfícies dentais de crianças recém-nascidas ou de até 5 anos de idade (KONONEN *et al.*, 1992, citado por LIJEMARK & BLOOMQUIST, 1996; KOLENBRANDER *et al.*, 2002).

Espécies bacterianas pioneiras protegem a superfície dental por competir com os microorganismos patógenos pelos sítios de ligação da película dental adquirida. Estes microorganismos podem trazer algumas moléculas na sua superfície que favorecem determinados tipos de mecanismos de adesão bacteriana, em nichos

ecológicos variados da cavidade bucal (SCANNAPIECO, 1994; SOKURENKO *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2001). Frequentemente, proteínas especializadas encontradas na membrana externa das paredes celulares bacterianas chamadas adesinas, controlam a ligação específica de microrganismos a receptores na superfície dental do hospedeiro (SCANNAPIECO, 1994). Provavelmente as bactérias aderem à superfície dentária devido a um sistema de reconhecimento que apresentam nas suas superfícies, que habilita as adesinas a ligarem-se às moléculas complementares da película dental adquirida (GIBBONS, 1998). As adesinas têm sido associadas com as fímbrias, fibrilas, pili, ou mais apropriadamente, a apêndices externos não flagelados bacterianos, e em bactérias gram negativas, associadas à membrana externa celular ou vesículas (LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996).

### 2.2.3 Mecanismo de adesão das bactérias à película dental adquirida

Diversas adesinas bacterianas foram identificadas e podem reconhecer diferentes receptores salivares presentes na superfície dos dentes (Quadro 1), como por exemplo, as moléculas de adesão pertencentes à família de antígenos I/II, a família de polipeptídeos Lral (Ssp em *S. gordonii*, AgB/PI/SpaP/PAC em *S. mutans* e SpaA/PAG em *S. sobrinus*), proteínas ligantes à amilase e lectinas de superfície. A existência de inúmeras adesinas não apenas capacita uma célula bacteriana a ligar-se mais rapidamente a um receptor salivar da película dental adquirida como também permite ao microrganismo ligar-se a outros receptores salivares na mesma superfície dental, criando uma ligação firme (MURRAY *et al.*, 1986; JENKINSON; DEMUTH, 1997, citado por LI *et al.*, 2004). Esta multiplicidade de proteínas de adesão é observada em *S. gordonii*. Este microorganismo adere às aglutininas salivares através da proteína SspA/B, de uma lipoproteína homóloga à de *S. mitis* e pela proteína *clpE*, homóloga a adesina de *Lactococcus lactis*. A adesão de *S. gordonii* à  $\alpha$ -amilase é mediada pela adesina AbpA e pelo reconhecimento do resíduo de ácido siálico presente nos oligossacarídeos dos glicoconjugados do hospedeiro, através da proteína Hsa (BROWN *et al.*, 1999; DEMUTH *et al.*, 2001; ROGERS *et al.*, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2002).

**QUADRO 1 – ADESINAS BACTERIANAS QUE MEDIAM A LIGAÇÃO INICIAL ÀS MACROMOLÉCULAS A PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA**

<b>Adesina</b>	<b>Massa molecular aproximada (kDa)</b>	<b>Espécies</b>	<b>Substrato</b>
família antígenos I/II, [AgB, P1 (SpaP), PAc, SpaA, PÁG, SspA, SspB, SoaA]	160-175	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. intermedius</i>	aglutinina salivar da parótida, glicoproteínas salivares, proteínas ricas em prolina, colágeno
Família Lral [FimA, SsaB]	35	<i>S. parasanguis</i> , <i>S. sanguis</i> ,	componentes salivares na película dental adquirida
Fap1	200	<i>S. parasanguis</i>	componentes salivares na película dental adquirida
proteínas de ligação à amilase	82, 65, 20, 15, 12	<i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. crista</i>	$\alpha$ -amilase
Complexo antígeno	80, 62, 52	<i>S. gordonii</i>	proteína salivar submandibular 73 kDa
lectinas de superfície	96, 70, 65	<i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i>	proteína salivar contendo ácido N-acetil murâmico
proteínas associadas a fímbrias tipo 1		<i>A. naeslundii</i>	estaterina, proteína rica em prolina

**FONTE:** adaptado de ROSAN, B & LAMONT, R.J. *Microbes and Infection*, v.2, p 1599-1607, 2000.

A adesão bacteriana mediada pelas adesinas ocorre via interações tipo lectina (proteína – oligossacarídeos), interações proteína-proteína e interações hidrofóbicas e/ou iônicas entre os componentes da superfície bacteriana e o substrato de adesão (JENKINSON; LAMONT, 1997; LI *et al.*, 2001; RUHL; SANDBERG; CISAR, 2004).

As interações do tipo lectina podem ocorrer pela interação de fímbrias presentes na superfície dos colonizadores primários com as mucinas de baixo peso molecular (MG2) e com a cadeia pesada da imunoglobulina A1(IgA1). Nas mucinas, os resíduos terminais do ácido siálico e da galactose  $\beta$  1-3 é que são reconhecidos enquanto que as imunoglobulinas são reconhecidas pelas lectinas de alta afinidade presentes nas fímbrias. Além delas, proteínas salivares também presentes na película dental adquirida, como  $\alpha$  - amilase, fibronectinas, lactoferrinas e  $\alpha$ -2 macroglobulinas estão envolvidas na ligação dos estreptococos e fornecem receptores para a adesão inicial (GIBBONS *et al.*, 1989; PELLAT; MILLER; GUEZ, 2002; JENKINSON; LAMONT, 2005). Na ausência de um receptor protéico apropriado, espécies de *Actynomices spp.* aderem a resíduos galactosil das glicoproteínas expostas devido a atividade enzimática das neuraminidases bacterianas (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Um exemplo de interações adesinas- proteína salivar bacterianas é a ligação de fímbrias tipo I presentes em *Actynomices naeslundii* e *S. gordonii* às proteínas ricas em prolina (PRPs) acídicas e estaterinas, mais especificamente ao dipeptídeo prolina<sup>149</sup>-glutamina<sup>150</sup>, que consiste em um motivo repetido no domínio carboxi-terminal destas glicoproteínas (LI *et al.*, 1999; 2001). PRPs acídicas correspondem de 25 a 30% das proteínas totais da saliva e são divididas em duas classes: PRPs alélicas grandes (PIF-s, Db-s, Pa, PRP-1, e PRP-2), codificadas pelos loci PRH1 e PRH2 no cromossomo 12p13.2 e variantes pós-traducionais ou PRP acídicas pequenas (PRP-3, PRP-4, PIF-f e Db-f), com as moléculas destas 2 classes variando de 150 a 170 resíduos (AZEN, 1993; HAY, 1988). A variante PRP-1, uma das mais importantes moléculas presentes na película dental adquirida, serve tanto como receptor como fonte de nutriente para os colonizadores primários (HAY *et al.*, 1988). A adsorção das PRPs e estaterinas à superfície dental causa uma mudança conformacional nestas proteínas que expõem segmentos crípticos ou “cryptitopes”, que são reconhecidos pelos receptores presentes na superfície das bactérias (JENKINSON; LAMONT, 2005).

A atividade enzimática bacteriana tem uma importante função no controle da adsorção dos microrganismos. Estas enzimas podem modificar constituintes da película dental adquirida, destruindo receptores de algumas espécies ou expondo novos receptores específicos para outras espécies (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Espécies como *S. gordonii* e *S. sanguinis* competem com o *S. mutans* pelos mesmos sítios de ligação da película dental adquirida e são capazes de produzir compostos antimicrobianos, tais como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, impedindo a colonização destes últimos (KRETH *et al.*, 2008). Acreditava-se que os estreptococcus do grupo Mutans constituíam uma parte significativa da microbiota inicial por causa da capacidade destes microrganismos de produzir polissacarídeos extracelulares (PECs) a partir da sacarose; entretanto foi observado que estes microrganismos compreendem apenas 2% ou menos da microbiota inicial, independente da exposição individual à sacarose (NYVAD; KILIAN, 1986, citado por FEJERSKOV; KIDD, 2005).

#### 2.2.4 Mudança das condições ambientais do biofilme dental

A colonização primária ou biofilme inicial envolve a formação de uma comunidade relativamente simples, surgindo como microcolônias estruturalmente



acomodadas numa monocamada periférica de cocos e bacilos gram-positivos em divisão e uma região central contendo múltiplas bactérias. *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis* são as espécies identificadas expressivamente e juntas compreendem aproximadamente 80% da flora cultivável total. Já os bacilos pleomórficos gram-positivos, na maioria espécies de *A. naeslundii*, compõem de 5 a 10% do total. (YOSHIDA *et al.*, 2006). Muitos dos microrganismos presentes nesta porção inicial do biofilme dental são proteolíticos e interagem em um padrão seqüencial e coletivo, como um verdadeiro consórcio, para degradar proteínas e glicoproteínas do fluido crevicular gengival e convertê-las em metano e H<sub>2</sub>S e também, pelo consumo de O<sub>2</sub>, em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (MARSH, 2003). Desta forma, as condições ambientais podem mudar durante o desenvolvimento do biofilme dental reduzindo o potencial redox e criando um ambiente mais suscetível ao crescimento dos colonizadores tardios, espécies mais agressivas, muitas destas estritamente anaeróbicas, que não tem estruturas de aderência (colonizadores secundários), gerando desta maneira o processo de sucessão bacteriana (MARSH, 2003; THOMAS; NAKAIASHI, 2006).

#### 2.2.5 Co-agregação e sucessão bacteriana

Não se pode dizer que todas as pessoas são colonizadas por todas as espécies bacterianas ao mesmo tempo, mas que a maioria dos hospedeiros terão uma comunidade estável de microrganismos. Uma vez formada esta comunidade microbiana, geralmente não ocorre a transferência de espécies bacterianas específicas entre indivíduos, a menos que mudanças drásticas ambientais e/ou mudanças habituais ocorram (LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996). Em indivíduos com boas condições de saúde bucal e periodontal existe um equilíbrio entre os mecanismos de adesão e retenção do biofilme e as forças abrasivas que provocam a sua redução (LINDHE, 2005). Estas forças interativas podem ser influenciadas por uma série de condições ambientais, tais como: fluxo salivar, uso de enxaguatórios bucais ou a presença de biosurfactantes liberados pela flora bucal residente, que irão interferir com a adesão das espécies competidoras (VAN HOOOGMOED *et al.*, 2006).

## QUADRO 2 – ADESINAS QUE REGULAM A CO-AGREGAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES BACTERIANAS ORAIS

Espécies	Adesinas	Massa molecular aproximada (kDa)	Receptor	Espécies coagregadas
<i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i>	Familia antígenos I/II (SspA, SspB)	171,160	proteína de superfície manoproteínas de leveduras	<i>P. gingivalis</i> , <i>S. mutans</i> <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i>
<i>S. gordonii</i>	CshA, CshB	259	proteínas de superfície manoproteínas de levedura	<i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
<i>S. gordonii</i>	familia Lral (ScaA) adesina de coagregação	35 100	carboidratos contendo lactose ou lactose	<i>P. gingivalis</i> , <i>S. mutans</i> <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> <i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
<i>S. salivarius</i>	antígeno B fibrilar (VBP)	320	polissacarídeo da parede celular com ligações glicosídicas	<i>Veillonella parvula</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
<i>A. naeslundii</i>	fímbria tipo 2	95	Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ e GalNAc $\beta 1 \rightarrow 3$ Gal	
<i>P. gingivalis</i>	Fimbrilina	43	proteína de superfície	<i>S. gordonii</i> , <i>S. oralis</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
<i>P. loescheii</i>	proteína associada à fímbria	45		<i>A. israelii</i>
<i>F. nucleatum</i>	proteínas da membrana externa receptor cornucob	42,30	carboidratos contendo galactose	<i>P. gingivalis</i>
<i>F. nucleatum</i> , <i>Veillonella atypica</i>	proteína da membrana externa	39 45	carboidratos contendo lactose ou lactose	<i>S. cristatus</i> <i>Streptococcus spp.</i>
<i>C. gingivallis</i> , <i>C. achracea</i> , <i>Treponema medium</i>	proteína da membrana externa	140 155 37	carboidratos da parede celular	<i>A. israelii</i> <i>S. oralis</i> <i>P. gingivalis</i>

**FONTE:** adaptado de ROSAN, B & LAMONT, R.J. *Microbes and Infection*, v.2, p 1599-1607, 2000.

A sucessão microbiana é resultante da criação de um ambiente mais atrativo e menos desfavorável pelos colonizadores primários e que favorece a interação dos colonizadores secundários, influenciando na composição acelular e celular do biofilme e conduzindo a uma substituição gradual por outras espécies mais adequadas ao habitat modificado (BOWDEN; HAMILTON, 1998; FEJERSKOV; KIDD, 2005). À medida que os depósitos bacterianos tornam-se mais espessos, ocorre redução na concentração de oxigênio, o que favorece a troca progressiva das bactérias aeróbicas pelas anaeróbicas facultativas até alcançar uma situação na qual as anaeróbicas estritas e facultativas predominam (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Nesta sucessão bacteriana, a adesão dos colonizadores secundários ocorre pela interação de sistemas receptor-adesinas com as espécies de microrganismos já existentes no biofilme e este processo é denominado de coagregação (Quadro 2). (KOLENBRANDER; LONDON, 1993a; BOS *et al.*, 1994; BUSSCHER; VAN DER MEI, 1997; KOLENBRANDER, 1998; KOLENBRANDER *et al.*, 2000). Espécies de *Fusobacterium*, detentoras de um sistema de adesinas na sua superfície, se ligam às glicoproteínas ricas em prolina da película dental adquirida, agindo também como pontes de co-adesão entre as espécies aeróbicas pioneiras e as anaeróbicas tardias, explicando como ocorre a sucessão bacteriana e porquê estas espécies gram-negativas aparecem com um número elevado nos sítios saudáveis e doentes (WHITTAKER; Klier; KOLENBRANDER, 1996; BRADSHAW *et al.*, 1998; KOLENBRANDER, 2000; THOMAS; NAKAIASHI, 2006). Neste estágio, o biofilme é estruturalmente similar a “espigas de milho”, compostas por um filamento central coberto por microrganismos esféricos (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Espécies aeróbicas facultativas gram-positivas como *A. naeslundii*, *S. mutans*, *S. oralis* e *S. sanguis* não se aderem diretamente com qualquer bactéria gram negativa anaeróbica estrita, como *P. gingivalis* e *P. nigrescens*; assim como *F. nucleatum* media; esta coagregação se dá através da formação de “corncoobs”, uma interação altamente específica dependente da presença de tufo polares nas fímbrias dos estreptococos orais, ou via hemaglutinina (TAKEMOTO *et al.*, 1993; CORREIA *et al.*, 1995). Este processo facilita uma sucessão microbiana ordenada durante a formação do biofilme dental e o desenvolvimento de uma comunidade clímax. Embora todos os colonizadores tardios coagreguem com *F. nucleatum*, eles geralmente não coagregam entre si (BRADSHAW, 1998; KOLENBRANDER, 2002).

Durante o processo de sucessão bacteriana, a coesão da matriz do biofilme é mantida pela camada de aglutininas salivares, encontrada na periferia do biofilme dental, que recobre as bactérias pioneiras e auxilia na interação entre espécies semelhantes ou diferentes. Juntamente com ela há a coagregação específica e direta que envolve a interação de um complexo de adesinas de bactérias planctônicas e receptores de bactérias residentes. Finalmente, o terceiro mecanismo de coesão da matriz envolve a síntese de polissacarídeos extracelulares pelas bactérias do biofilme dental (LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996). A síntese de polímeros extracelulares é acompanhada com a formação de espaços e canais que acompanham a espessura inteira ao longo da matriz extracelular e cria gradientes de concentração (influenciando a passagem de nutrientes), permitindo a aglutinação e a sobrevivência bacteriana (WOOD *et al.*, 2000; HICKS *et al.*, 2002).

Quando a microbiota amadurece (2 semanas ou mais) formando a comunidade clímax, alterações estruturais características são notadas desde as porções mais profundas até a superfície do biofilme. Uma alteração marcante consiste na formação de uma camada interna de bactérias pleomórficas gram positivas, basicamente *Actinomyces spp.*, muito condensadas, que estão próximas da superfície, junto com uma camada externa geralmente fraca, podendo esta microbiota mais externa ser organizada no formato de esferas ou estruturada de maneira paralela à superfície do dente (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Com a maturação do biofilme dental, as bactérias tornam-se destacáveis e podem colonizar superfícies adjacentes ao dente ou dentes vizinhos (GARCÍA-GODOY; HICKS, 2008).

A ruptura do equilíbrio da microbiota residente no biofilme causada por uma mudança nas condições ambientais locais ou por deficiência e/ou disfunção das defesas do hospedeiro, pode conduzir a doenças (MARSH *et al.*, 1995). Mudanças nas condições ambientais, como redução do fluxo salivar ou, mais frequentemente, aumento do consumo de substratos fermentáveis, resultam na diminuição do pH da placa bacteriana e formação de cárie dental (MARSH, 1999). Quando a frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis aumenta, o biofilme dental permanece por mais tempo com pH abaixo do valor crítico à desmineralização do esmalte (5,5). Este quadro favorece a proliferação de bactérias acidogênicas e acidúricas – especialmente estreptococcus do grupo Mutans e lactobacilos – que metabolizam carboidratos pela glicólise sintetizando mais ácido, o que propicia maior

solubilização dos cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) do esmalte dentário (FEJERSKOV; KIDD, 2005; LEMOS et al., 2005). Quando o pH é mantido acima de 5,5 por um período de tempo significativo, a remineralização do esmalte poderá reverter o dano inicial, mas a uma velocidade muito inferior àquela da desmineralização (MOBLEY, 2003).

Esta manutenção e exposição a ácidos resulta, além de um aumento nos números e proporções de *S. mutans*, numa elevação no número de *S. sobrinus*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Candida albicans*, enquanto as proporções de *S. sanguinis* e *A. naeslundii* diminuem (BEIGHTON, 2007). Alguns dados sugerem que os lactobacilos são favorecidos em sua habilidade de colonizar pela colonização inicial dos estreptococos do grupo Mutans, especialmente *S. sobrinus*, indicando, portanto, que os lactobacilos não são necessários para o desenvolvimento das lesões, todavia, eles podem contribuir potencialmente à desmineralização de algumas lesões coronárias ou radiculares (TANZER et al., 2001).

#### 2.2.6 Relação do *S. mutans* e o biofilme dental cariogênico

*S. mutans* é considerado um dos agentes primários da cárie dental e também pode ser uma fonte da endocardite bacteriana. Os fatores de virulência, associados com a cariogenicidade deste microrganismo, incluem capacidade de adesão à superfície dental e acidogenicidade e mecanismos de tolerância a ácidos. Estes mecanismos são importantes para garantir a sobrevivência deste microrganismo quando ocorre um aumento da ingestão de carboidratos fermentáveis pelo hospedeiro, o que gera uma alteração na ecologia do biofilme dental e favorece o aumento da proporção desta espécie e de outras com qualidades semelhantes, como lactobacilos e leveduras (BANAS et al., 2004). Além destes organismos, *S. sobrinus* e espécies de *Actinomyces* e, em menor número de autores, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *Streptococcus anginosus* também são consideradas bactérias cariogênicas (GARCÍA-GODOY; HICKS, 2008).

Estreptococos do grupo mutans é um termo geral usado para várias espécies intimamente relacionadas de estreptococos humanos, originalmente descritas como

diferentes sorotipos de *S. mutans*. Este nome, em específico, é limitado a espécies isoladas previamente pertencentes aos sorotipos c, e, f ; já d, g e h são para *S. sobrinus*, o sorotipo a para *cricketus* e b para *rattus* (KLEINBERG, 2002; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Os estreptococos do grupo Mutans, potencialmente cariogênicos, podem ser encontrados naturalmente no biofilme dental porém, em pH neutro, esses organismos são fracamente competitivos e estão presentes apenas em uma pequena porção da comunidade total do biofilme dental (FEJERSKOV; KIDD, 2005). A sua adesão com o biofilme dental pode ser mediada por mecanismos sacarose-independente e sacarose-dependente (BANAS *et al.*, 2004). No mecanismo sacarose independente, o mediador é a proteína SpaP, também conhecida como antígeno I/II ou PAc. O gene SpaP codifica uma proteína de superfície na bactéria, que tem atividade de adesina multifuncional e facilita a ligação da bactéria à superfície da película dental adquirida (LEMOS *et al.*, 2005). Muitos estreptococcus do grupo Mutans possuem adesinas PI, SAI/II e AgnB, que permitem a ligação destes organismos à película dental adquirida, embora com menor afinidade do que estreptococcus do grupo Sanguis (LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996). *S. mutans* que não produzem a proteína SpaP não aderem a superfície da película, mas são capazes de colonizar a superfície dental através do mecanismo sacarose dependente (BOWDEN *et al.*, 1991; CROWLEY *et al.*, 1999).

Na cavidade bucal, as concentrações de carboidratos fermentáveis como a sacarose podem aumentar rapidamente, variando de 10  $\mu$ M durante períodos de jejum a 10 mM durante períodos de consumo em excesso (LEMOS *et al.*, 2005). As dietas baseadas em sacarose têm um papel importante para as bactérias bucais fornecendo fonte de energia, promovendo a produção de ácido láctico, reduzindo o pH bucal e agindo como um substrato para as glucosiltransferases dos estreptococos orais para a produção de glucanas solúveis e insolúveis (BOWDEN; LI, 1997). A ação das glucosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftfs) na síntese de glucanas e frutanas, respectivamente, é responsável pela adesão via mecanismo sacarose dependente.

A sacarose, um dissacarídeo fermentável e difusível encontrado na dieta, além de ser metabolizado pelas bactérias do biofilme dental, é substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares (PECs), solúveis e insolúveis, e intracelulares (PICs). Os PECs solúveis e insolúveis promovem a adesão bacteriana

de estreptococos orais à superfície dental e a outras bactérias e contribuem para a integridade estrutural dos biofilmes, já os PICs fornecem um estoque de glucose que podem ser metabolizados para a produção de energia quando a disponibilidade de carboidratos é limitada (SCHILING; BOWDEN, 1992; BOWDEN; LI, 1997; JENKINSON; LAMONT, 1997; BANAS *et al.*, 2004; FEJERSKOV; KIDD, 2005; KRETH *et al.*, 2005; PAES LEME *et al.*, 2006).

Estreptococos orais, principalmente o *S. mutans*, capturam a sacarose para dentro da célula bacteriana e convertem-na em formas solúveis e insolúveis pela atividade enzimática das Gtfs, através da quebra da sacarose e o fornecimento de substratos naturais para as mesmas, glucose e frutose (HAMADA, KOGA, OOSHIMA, 1984; COLBY; RUSSEL, 1997; BANAS, 2004). Os PECs também permitem o aumento da porosidade dos biofilmes formados, permitindo que o açúcar difunda-se nas regiões mais profundas do biofilme, o que resulta na queda do pH devido ao catabolismo microbiano (ZERO; VAN HOUTE; RUSSO, 1986; DIBDIN; SHELLIS, 1988).

A adesão sacarose dependente pode envolver a ligação dos estreptococcus do grupo Mutans na superfície dental através da síntese de glucanas propriamente dita ou pela aglutinação de *S. mutans* às glucanas já presentes no biofilme dental. A habilidade do *S. mutans* de se aderir seria facilitada devido a interações por pontes de hidrogênio entre estes polímeros de açúcar extracelulares e à superfície dental e/ou superfície bacteriana do biofilme. O processo de aglutinação pode estar envolvido com a expressão de proteínas não enzimáticas de ligação a glucanas, como: GbpA, GbpB, GbpC, GbpD, auxiliando na natureza coesiva do biofilme dental (SCHILING; BOWEN, 1992; BANAS *et al.*, 2004).

As glucanas presentes no biofilme dental são sintetizados a partir da sacarose pela atividade das enzimas Gtf: GtfB e GtfC, que produzem principalmente glucanos insolúveis em H<sub>2</sub>O com ligações glucosídicas  $\alpha$  (1-3) – denominados mutanos – e GtfD, que forma glucanos solúveis em H<sub>2</sub>O com ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-6), denominados dextranos (KRETH *et al.*, 2005). A ação cooperativa destas três enzimas é considerada essencial para a aderência celular bacteriana (COLBY; RUSSEL, 1997). Enzimas GtfB e GtfC que sintetizam principalmente glucanos insolúveis, são localizadas na superfície celular do *S. mutans* e codificados pelos genes *gtfB* e *gtfC*, respectivamente; em contrapartida, a enzima GtfD, a qual

sintetiza glucanos solúveis, é liberada na cultura sobrenadante e codificada pelo gene *gtfD* (KURAMITSU, 1993).

As frutanas, polímeros lineares que consistem unicamente de unidades de frutose, são sintetizadas também a partir da sacarose pelos estreptococos orais. As unidades de frutose são conectadas por ligações  $\beta$  (2-6), estruturas denominadas de levanas, ou por ligações  $\beta$  (2-1). Apesar de várias evidências revelarem uma taxa alta na síntese de frutanas pelos estreptococos orais, níveis reduzidos são encontrados no biofilme dental devido à sua alta taxa de renovação e sua rápida degradação. As frutanas e levanas também servem como moléculas de estoque para conversão em energia, quando a disponibilidade de carboidratos é restrita (COLBY; RUSSEL, 1997).

A força coesiva da matriz do biofilme dental é mantida em grande parte pelos glucanos extracelulares produzidos por estreptococcus. Entretanto, os glucanos sintetizados a partir da sacarose, frutose e/ou glucose por algumas espécies também podem ser importantes nas fases iniciais do desenvolvimento da placa, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. *A. viscosus* e *A. naeslundii* podem produzir heteropolímeros complexos de glucose e levanos derivados da sacarose, enquanto *Neisseria mucosa* e *Neisseria subflava* sintetizam dois tipos de polissacarídeos a partir da sacarose e *Stomatococcus mucilagenosus* podem também sintetizar heteropolímeros de carboidratos extracelulares (OOSHIMA; KURAMITSU, 1981; LIJEMARK; BLOOMQUIST, 1996; BOWDEN; LI, 1997; BOWDEN; HAMILTON, 1998; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001).

A importância da produção destes polímeros (extra e intracelulares) na colonização, retenção e fornecimento de energia aos estreptococos orais no biofilme dental é apoiada pelos experimentos com sistemas de modelos animais e estudos com humanos que demonstraram a colonização acentuada de *S. mutans* na presença de sacarose (BOWDEN; HAMILTON, 1998). A aquisição de espécies tais como estreptococcus do grupo Mutans pode ocorrer de maneira mais efetiva em determinadas idades (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Por exemplo, logo após a erupção dos primeiros dentes decíduos, a colonização do *S. mutans*, que era esporádica anteriormente, aproxima-se de 20% em crianças de 12 a 18 meses de idade ou até mesmo 25% em crianças com 1 ano de idade de centros urbanos, coincidindo com a chamada “janela de infectividade” específica (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993; GARCÍA-GODOY; HICKS, 2008). A detecção de *S. mutans* foi observada com



uma frequência alta quando a dentição decídua está completa e os contatos proximais entre os molares decíduos estão presentes (ROETERS *et al.*, 1995).

A produção de bacteriocinas também chamadas mutacinas contribui para a capacidade acidogênica e acidúricas do *S. mutans*. As bacteriocinas são peptídios ou antibióticos protéicos, que agem como bactericida para microrganismos de espécies semelhantes ao *S. mutans*, conferindo uma vantagem ecológica para estes organismos durante o desenvolvimento dos biofilmes dentais (BALAKRISHNAN *et al.*, 2002). Espécies de *S. mutans* produzem quatro mutacinas (chamadas I, II, III e IV), divididas em dois grupos (classe I ou lantibióticos e classe II ou não-lantibióticos), sendo que o sistema de competitividade efetivo do *S. mutans* estaria vinculado principalmente à produção da mutacina IV, trazendo uma grande vantagem sobre os colonizadores primários, tal como *S. sanguinis* (QI *et al.*, 2001; KRETH *et al.*, 2005).

A capacidade de sobreviver a rápidas e extremas mudanças no pH, assim como a manutenção do ambiente ácido, são as mais importantes atribuições das bactérias cariogênicas (LEMOS *et al.*, 2005). Estreptococos orais possuem várias estratégias adaptativas de tolerância a ácidos, algumas das quais são pertencentes a todas as espécies e, para outras, únicas. O sistema  $F_0F_1$ -ATPase translocador de prótons, comum a todos os estreptococos orais, é o principal mecanismo de manutenção do pH intracelular mais alcalino (em torno de 7,5) que o do meio ambiente, conferindo proteção às enzimas glicolíticas sensíveis a ácidos e mantendo o  $\Delta$ pH compatível com os processos bioenergéticos. Há mecanismos protetores adicionais que aparecem em certas espécies, tais como a produção de amônia, a partir da hidrólise da uréia pelo *Streptococcus salivarius* e *A. naeslundii*, e de arginina por *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. rattus* (CLANCY *et al.*, 2000; QUIVEY; KUHNER; HAHN, 2001; LEMOS *et al.*, 2005).

O sistema enzimático arginina-deiminase, inativado na presença de glucose, é encontrado em *S. sanguis* e em alguns estreptococos do grupo Mutans. A sua reação é induzida em pH próximo de pH 5.7 e seu sistema fornece um mecanismo de sobrevivência para organismos com baixa tolerância a ácidos. Essencialmente, a arginina entra nas células bacterianas através de um sistema antiporte, é convertida em ornitina e, logo em seguida, transformada em carbamil fosfato e, eventualmente em amônia, molécula esta que elevaria o pH do biofilme dental (MARQUIS *et al.*, 1987; BURNE *et al.*, 1989; ROGERS *et al.*, 1988).

Com relação à síntese de amônia, às secreções salivares da cavidade bucal, juntamente com a dieta, contribuem como fontes de nitrogênio para a microflora oral residente (LEMOS *et al.*, 2005). Cooperação catabólica entre as bactérias orais permite que o nitrogênio das glicoproteínas salivares e da dieta sejam utilizados (BOWDEN; LI, 1997). A uréia é secretada continuamente na saliva e nos fluidos gengivais numa faixa de 3 a 10 mM em indivíduos saudáveis e é rapidamente hidrolisada pela ureases salivares da microflora bucal e convertida em amônia (CLANCY *et al.*, 2000). A uréia é encontrada em quantidades elevadas na margem gengival de indivíduos saudáveis, aparecendo também como o principal produto salivar em pacientes com doenças renais (PETTERSON; WOODHEAD; CRALL, 1985; BOWDEN; LI, 1997; NOWAISER *et al.*, 2003).

Existem dados indiretos que sugerem um papel importante para a ureólise no pH do biofilme dental. Concentrações elevadas de uréia e amônia salivares estão relacionadas com reduções marcantes na duração e extensão de acidificação do biofilme dental após mudanças na dieta de carboidratos. A hidrólise da uréia poderia neutralizar os ácidos presentes no biofilme dental e influenciar positivamente na sua ecologia, já que preveniria quedas no pH que poderiam selecionar microrganismos cariogênicos (BRADSHAW *et al.*, 1989; BURNE, 1998; CLANCY *et al.*, 2000).

As variações das condições nutricionais na cavidade bucal também representam um fator de estresse para os microrganismos do biofilme dental. Estudos de proteômica de *S. mutans* mostraram que quando este microrganismo cresce, em pH 5, aproximadamente 30 proteínas, 18 com a expressão aumentada (dentre elas a proteína GroEL, proteínas de divisão celular como FtsZ e FtsA e enzimas glicolíticas) e 12 com a expressão reduzida (como proteínas ribossomais de subunidades longa e curta, fatores protéicos de alongamento na tradução e a proteína DnaK) são sintetizadas e a maioria está envolvida nos processos de replicação, transcrição, tradução, enovelamento e proteólise (WILKINS; HOMER; BEIGHTON, 2002; LEN; HARTY; JACQUES, 2004; LEMOS; ABRANCHES; BURNE, 2005). Estes dados sugerem que a resposta adaptativa do microrganismo requer um aumento da síntese protéica. Assim, a disponibilidade, transporte e biossíntese de aminoácidos por *S. mutans* podem agir como fatores limitantes do crescimento bacteriano em resposta do microrganismo às mudanças do meio extracelular. *Streptococcus mutans* pode contar com ATPases, moléculas que promovem o bombeamento de prótons para o ambiente extracelular, ou mesmo com a expressão

de um regulador global denominado *vicR*, que tem um papel importante na expressão de glucosiltransferases e frutossiltransferases, em resposta a variados estímulos. Estes fatores de virulência do *S. mutans* podem ser expressões de maneira limitada, dependendo das condições de crescimento do microorganismo (DASHPER; REYNOLDS, 1992; QUIVEY; KUHNER; HAHN, 2000; WILKINS; HOMER; BEIGHTON, 2002; BANAS *et al.*, 2004; SHEMESH *et al.*, 2006). Todas estas evidências mostram que o metabolismo de compostos nitrogenados pode ser importante para a sobrevivência dos microrganismos orais durante os períodos de fartura e escassez destes compostos à base de nitrogênio na cavidade bucal, entretanto, não existem artigos que relatem a influência do metabolismo nitrogenado na formação e composição do biofilme dental.

Em indivíduos saudáveis, a associação entre a alta frequência de ingestão de carboidratos na dieta durante o dia, principalmente a sacarose, ou a duração destes açúcares permanecendo retidos na cavidade bucal, permite inferir que estes podem se tornar mais susceptíveis ao desenvolvimento de cárie dental (BOWDEN; LI, 1997; LUCAS; ROBERTS, 2005; SISSONS *et al.*, 2007). Estudos em modelos animais têm mostrado que uma dieta rica em glucose ou sacarose, em comparação com períodos de jejum, tem pouco efeito nos estágios iniciais de desenvolvimento dos biofilmes dentais, todavia, a dieta pode influenciar as proporções de espécies bacterianas secundárias no desenvolvimento do biofilme (BOWDEN; LI, 1997).

Há uma evidência de que espécies cariogênicas, tais como estreptococos do grupo Mutans (*S. mutans*, *S. sobrinus*) e *Lactobacillus spp.* estão associadas com a prevalência e o início da cárie dental (LOESCHE, 1986). Em contrapartida, trabalhos realizados por TENUTA *et al.* (2006), sugerem que a exposição ao açúcar é mais relevante para a predominância de *Lactobacillus spp.* do que *S. mutans* e que os PECs insolúveis não mudam a quantidade total destas duas espécies de microrganismos. Estes trabalhos podem sugerir que a cárie dental pode ocorrer na ausência de estreptococos do grupo Mutans e que a origem da lesão não seria causada apenas por um patógeno específico, mas pelas combinações diferentes de bactérias, em associação com os vários estágios de desenvolvimento da lesão (MARSH *et al.*, 1989).

#### 2.2.7 Metabolismo de N<sub>2</sub> no biofilme dental

A presença de compostos nitrogenados no biofilme esta associada à manutenção do pH e pode ocorrer devido a produção de amônia, a partir da hidrólise da uréia e da arginina que alcaliniza o biofilme (CLANCY *et al.*, 2000; QUIVEY; KUHNER; HAHN, 2001; LEMOS *et al.*, 2005).

Concentrações elevadas de uréia e amônia salivares estão relacionadas com reduções marcantes na duração e extensão de acidificação do biofilme dental após a ingestão de carboidratos (BOWDEN; HAMILTON, 1991; BRADSHAW; MCKEE; MARSH, 1989; BURNE; PARSONS; MARQUIS, 1998). A hidrólise da uréia pode neutralizar os ácidos presentes no biofilme dental e influenciar positivamente na ecologia do biofilme dental, prevenindo quedas no pH do biofilme que poderiam selecionar microrganismos cariogênicos (BRADSHAW; MCKEE; MARSH, 1989; BURNE; PARSONS; MARQUIS, 1998; CLANCY *et al.*, 2000).

Os níveis de uréia no biofilme e os níveis de microrganismos urease-positivos também são altos nestes pacientes (BOWEN; TABAK, 1995). Estes fatores provavelmente contribuem para explicar a baixa prevalência de cárie dental nestes pacientes que realizarem uma dieta rica em carboidratos que são recomendados sem restrições, enquanto a ingestão de proteínas é limitada (BOWEN; TABAK, 1995). Além disso, a quantidade de biofilme presente na superfície dentária de pacientes com doença renal é maior que a de biofilme presente em grupo controle (NOWAISER *et al.*, 2003) e o fluxo salivar de pacientes em hemodiálise significativamente menor que o fluxo salivar de pacientes saudáveis (BAYRAKTAR; KAZANCIOGLU; BOZFAKIOUGLU, 2004).

A baixa prevalência de cárie pode ser atribuída em parte a maior capacidade tampão e ao maior pH da saliva desses indivíduos com relação ao grupo controle devido a hidrólise da uréia pelas bactérias do biofilme (NOWAISER *et al.*, 2003). A quantidade total de *S. mutans* presente no biofilme dental de crianças com doenças renais crônicas foi significativamente menor que a quantidade obtida para o grupo controle (NOWAISER *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que o excesso de compostos nitrogenados na cavidade bucal somada a dietas ricas em carboidratos realizadas por este tipo de paciente pode interferir com o processo de formação de biofilme por *S. mutans*.

Apesar dos altos níveis de uréia na saliva potencialmente protegerem os dentes da desmineralização, eles também favorecem uma maior prevalência de cálculo dental (PETERSON; WOODHEAD; CRALL, 1985; BOTS *et al.*, 2006). Uma

forte correlação entre dentes com sangramento gengival e dentes cobertos com biofilme dental e cálculo foi encontrada nestes pacientes (BOTS *et al.*, 2006).

Estes resultados sugerem que o excesso de compostos nitrogenados na cavidade bucal, juntamente com dietas ricas em carboidratos realizadas pelo paciente com disfunção renal pode mudar o microambiente do biofilme dental, favorecendo o crescimento de outras espécies.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o biofilme dental formado “*in situ*” sobre esmalte dental bovino, em presença de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, simulando a situação de pacientes com disfunção renal crônica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a morfologia do biofilme formado “*in situ*”, na presença de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio por microscopia de força atômica.
- Analisar a composição do perfil protéico da matriz extracelular e intracelular do biofilme dental formado *in situ* na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.
- Determinar a quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus spp* presentes no biofilme formado *in situ*, na presença de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho o voluntário foi o estudante envolvido na pesquisa, por conhecer a necessidade da utilização do dispositivo intra-bucal adequadamente e por preencher as seguintes necessidades: não fumante, saudável, de baixa susceptibilidade e risco à cárie dental e doença periodontal, boas condições de higiene bucal e não usuário de fármacos.

Os experimentos realizados foram do tipo duplo cego, desta maneira, o voluntário envolvido no projeto não sabia a composição das soluções que estava gotejando sobre os blocos de esmalte e nem o que estava analisando para evitar que os resultados fossem tendenciosos. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do setor de saúde – UFPR (Protocolo nº0077.0.091.000-07).

### 4.2 PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE DENTAL BOVINO

Os blocos de esmalte foram preparados a partir de incisivos centrais bovinos, obtidos no Frigorífico Argus. Os dentes bovinos foram coletados em recipientes de vidro contendo solução de formaldeído 2%, tamponada em pH 7 (tampão tris-HCl pH 8 – 50 mM; 20% formol). Após conservados pelo menos 7 dias em solução fixadora, os dentes foram limpos com curetas e profilaxia, procedimento este realizado com escova manual e/ou discos de feltro adaptados em mandril de peça de mão reta (Microdent®) mais pasta profilática, para retirar possíveis resíduos presentes na superfície dental. Em seguida, os dentes foram cortados em blocos de 4x4x1,0 mm, com discos de óxido de alumínio 22 mm x 0,6 mm (Dentorium®) e discos de carborundum 22,3 mm x 0,6 mm (Carbodont®), adaptados em mandris odontológicos de contra-ângulo (Edenta®) ou peça de mão reta, montado em peça de micro retífica (Dremel®).

Os blocos foram polidos em politriz (Arotec®) a 150-300 rpm. Inicialmente, o polimento foi realizado com discos de lixa d'água de granulação 1200# e, logo em seguida, em pano auto-adesivo para polimento metalográfico e suspensão

diamantada de 1  $\mu\text{m}$  (Arotec®) para polimento final. Os blocos de esmalte foram armazenados em um recipiente de vidro fechado contendo algodão umedecido em álcool 70% para evitar desidratação e contaminação dos dentes. Antes da montagem no dispositivo intra-oral palatino, os dentes foram autoclavados em vapor fluente, durante 20 minutos, a 1 atmosfera.

#### 4.3 DISPOSITIVO INTRA-BUCAL PALATINO

Uma moldagem da maxila do voluntário foi realizada para confecção do dispositivo intra-bucal com material hidrocolóide irreversível (alginato) (Alga Gel®). O molde foi vazado em gesso pedra especial tipo IV (Asfer®) para obtenção do modelo da maxila. Em cada experimento, 16 blocos de esmalte foram distribuídos em 2 grupos de 8 em cavidades retangulares confeccionadas na superfície externa do dispositivo intra-bucal (palato). Os blocos de esmalte foram fixados com fita dupla-face e resina acrílica quimicamente ativada (Duralay®). Em seguida, as cavidades foram cobertas com uma rede protetora de plástico que foi fixada com cera odontológica nº 7 (Figura 1). A rede foi utilizada para evitar a remoção do biofilme formado pelo atrito da língua. A retenção do dispositivo na cavidade bucal foi garantida pela inserção de grampos Arandela e vestibular, confeccionados com fio ortodôntico 0,7 mm (PR®).

**FIGURA 1 – DISPOSITIVO INTRA-BUCAL PALATINO.**



**A** - Canaletas retangulares contendo os blocos de esmalte dental bovino . **B** – Canaletas recobertas com a tela protetora



#### 4.4 FORMAÇÃO DO BIOFILME DENTAL

O voluntário usou o dispositivo intra-bucal por um período de 14 dias para cada um dos tratamentos. Durante este período, o voluntário gotejou 8 vezes ao dia a solução teste sobre os blocos de esmalte, em tempos aleatórios. As soluções utilizadas foram:

Tratamento 1: água destilada,

Tratamento 2: cloreto de amônio 0,5 M,

Tratamento 3: cloreto de amônio 0,5 M e sacarose 20%,

Tratamento 4: sacarose 20 %,

Tratamento 5: cloreto de amônio 0,5M, glucose 10% e frutose 10%,

Tratamento 6: glucose 10% e frutose 10%,

Tratamento 7: uréia 0,5 M.

A solução foi gotejada sobre os blocos de esmalte e após 1 minuto era introduzido novamente na cavidade bucal. Durante os experimentos o indivíduo foi orientado para remover o dispositivo ao ingerir alimentos ou bebidas e só recolocá-lo após a realização da higiene bucal. Durante estes períodos, o dispositivo era mantido em ambiente úmido, montado em um recipiente plástico com algodão embebido em H<sub>2</sub>O destilada.

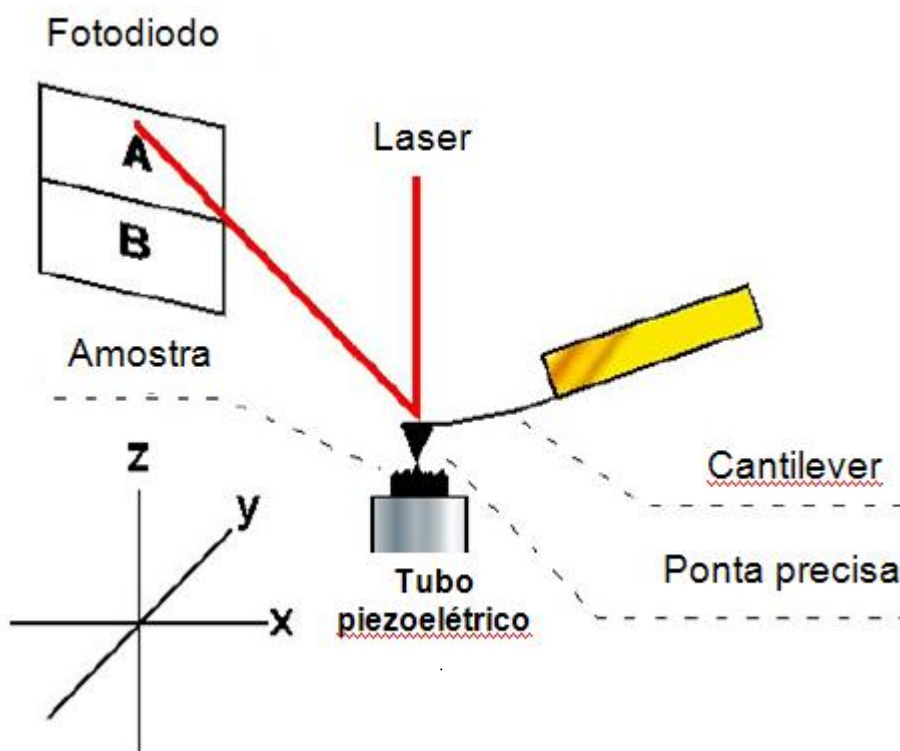
#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DE SUPERFÍCIE DO BIOFILME DENTAL

Após os 14 dias de uso do dispositivo intra-bucal, 2 blocos de esmalte (1 de cada canaleta) foram retirados do dispositivo sem danificar o biofilme para análise estrutural por Microscopia de Força Atômica. O MFA (Shimadzu SPM-9500J3, Departamento de Física UFPR) foi configurado para operar em modo dinâmico, em ar, a aproximadamente 24°C, número de pontos por imagem de 256X256 e velocidade de varredura de 1Hz.

O MFA é um dispositivo eletromecânico que funciona conforme mostrado na figura 2. Uma alavanca, denominada de cantilever, deflete quando uma ponta montada neste cantilever toca a superfície da amostra. A deflexão do cantilever é monitorada pela deflexão de um laser focalizado neste cantilever, o qual é refletido a um fotodiodo. O fotodiodo é dividido em duas áreas e, enquanto uma porção topográfica na superfície deflete o cantilever além ou abaixo do seu ponto de fixação, o raio do laser no fotodiodo é defletido em direção a outra. Durante a varredura, a força de interação entre a amostra e a ponta é mantida constante e o sinal de deflexão do cantilever é transmitido a um computador, que faz a conversão de variação do sinal no fotodiodo para variação de altura na amostra e gera um mapa topográfico da superfície da amostra, (NEVES; VILELA; ANDRADE, 1998; CISNEROS ARMAS, 2007). Isto é chamado de modo de imagem do MFA (CISNEROS ARMAS, 2007).

Em cada bloco de esmalte, imagens de 4 regiões diferentes foram obtidas, totalizando 8 regiões analisadas por tratamento.

**FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE FUNCIONAMENTO DO MFA**



Uma ponta precisa montada em um cantilever flexível interage com a superfície da amostra. O cantilever deflete sobre as porções topográficas desviando o raio do laser. A deflexão do laser é

defletida por um fotodiodo. O sinal é então transmitido para um mecanismo de resposta que mantém a força de interação constante entre a ponta e a amostra.

**FONTE:** CISNEROS ARMAS, D.A. *Molecular assemblies observed by atomic force microscopy*, p. 8, 2007.

#### 4.6 CONTAGEM DE MICROORGANISMOS PRESENTES NO BIOFILME DENTAL

O biofilme dental formado sobre 14 blocos de esmalte, após 14 dias de cada tratamento, foi coletado com palito estéril de madeira. O biofilme foi pesado em balança de precisão para determinação do peso úmido. Em seguida, o biofilme foi ressuspensionado em 100 a 200 µL de NaCl 0,9 %. Uma alíquota de 10µL foi diluída seriadamente para a contagem de *S. mutans* em Ágar-mitis-salivarius-bacitracina (BENELLI et al., 1993) e de *Lactobacillus spp.* em meio Ágar-Rogosa (ROGOSA; MITCHELL; WISEMAN, 1951). Estas placas foram incubadas a 37°C em meio micro-aerófilo, numa jarra Gaspack, durante 24-48 horas para os meios MSA-Bacitracina e 72 horas para meio Agar SL Rogosa. Em seguida, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas usando um contador manual e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por miligrama de peso úmido de biofilme dental (UFC/mg).

##### 4.6.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para a seleção de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* foram MSA (Hi Media®), suplementado com 30 µg/ml de bacitracina, e Agar SL Rogosa (ROGOSA; MITCHELL; WISEMAN, 1951), respectivamente.

O meio MSA-bacitracina de cultura foi dissolvido em água destilada morna conforme as instruções do fabricante. Em seguida o meio foi autoclavado durante 20 minutos, a 1 atmosfera. O meio Agar SL Rogosa foi preparado conforme descrito a seguir. Os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água destilada. O volume foi aferido e a solução foi fervida por 3 minutos. Em seguida, o ácido acético foi adicionado para ajustar o pH e o meio foi imediatamente distribuído nas placas de Petri.

## ÁGAR SL ROGOSA

Triptona.....	2 g/L
Extrato de levedura.....	1 g/L
Dextrose.....	2 g/L
Sacarose.....	1 g/L
Arabinose.....	1g/L
Fosfato monopotássico.....	1,2 g/L
Acetato de sódio.....	3 g/L
Citrato de amônio.....	0,4 g/L
Sulfato de magnésio.....	0,11 g/L
Sulfato de manganês.....	0,024 g/L
Sulfato ferroso.....	0,006 g/L
Polisorbato.....	1,25mL/L
Ágar.....	3 g/L

## 4.7 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

### 4.7.1 Extração das proteínas da matriz extracelular das bactérias do biofilme dental

Aos biofilmes coletados (item 4.6) foram adicionados NaOH para concentração final de 0,1 M e 1 mM de EDTA por miligrama de biofilme. As amostras foram agitadas em gelo por 1 hora e em seguida centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o pellet foi utilizado para extração das proteínas da matriz intracelular (item 4.7.2). A precipitação das proteínas da matriz extracelular foi realizada pela adição de 3 a 4 volumes de acetona ao sobrenadante. Após incubação em freezer -20°C overnight, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi removido e o pellet foi seco em estufa a 37°C.

As amostras foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise (Tris-HCl – 10 mM, MgCl<sub>2</sub> – 1,5 mM, DTT – 0,5 mM, PMSF – 0,5 mM) e inibidor de protease PMSF 0,1 M.

#### 4.7.2 Extração das proteínas da matriz intracelular das bactérias do biofilme dental

O primeiro pellet de biofilme dental obtido no item anterior foi lavado duas vezes com 1 mL de solução tampão fosfato PBS (KCl – 3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5 mM, NaCl – 68 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 9,0 mM). Após as lavagens, o pellet foi ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (o mesmo utilizado no item 4.7.1.) e submetido a 3 ciclos de congelamento-descongelamento. Em seguida, as amostras foram sonicadas 2 vezes por 20 segundos a 4°C, com intervalo de 1 minuto, e centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -20°C.

#### 4.7.3 Determinação do perfil protéico formado *in situ*

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). Em seguida, 5,3  $\mu\text{g}$  de cada amostra foi aplicada em gel SDS-PAGE 12,5% para determinação do perfil protéico. As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970). As amostras foram diluídas em 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra SDS 5x, aquecidas a 95°C por 3 minutos, centrifugadas por 10 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5%. A corrida eletroforética foi realizada por 40 minutos a 200 V em tampão contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% pH 8,3.

Após a corrida, os géis foram visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, conforme BLUM *et al.*, (1987). Para coloração com prata os géis unidimensionais permaneceram durante 1 hora em 50% metanol, 12% ácido acético e 0,5 mL/L formaldeído 37%, seguidas por 2 x 20 minutos em etanol 50%, 20 min em etanol 30%, 1 minuto em 0,2 g/L tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 3 lavagens com água destilada durante 20 segundos, 10 minutos em nitrato de prata 2 g/L e 0,75 mL de formaldeído 37%, 2 lavagens com água destilada durante 20 segundos, 10 min em 60 g/L de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0,5 mL/L formaldeído 37% com 4 mg/L de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 2 lavagens com água destilada durante 2 minutos, 10 minutos em 50% etanol e 12% ácido acético e 20 minutos ou mais de 50% metanol.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTRUTURA DO BIOFILME FORMADO EM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES

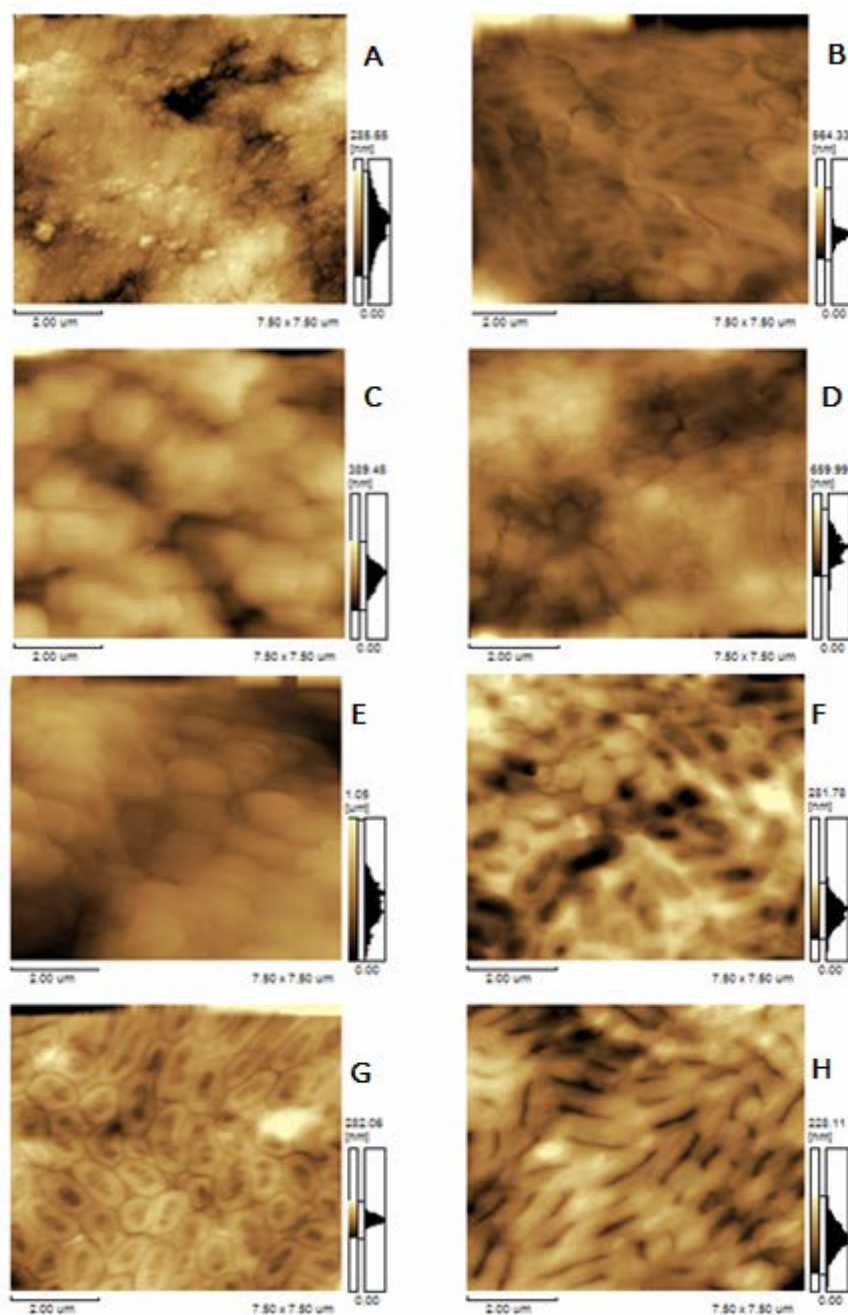
A microscopia de força atômica (MFA) ou microscopia de força por varredura está inserida em um amplo grupo de microscópios denominados microscópios de varredura por sonda mecânica (SANTOS; CASTANHO, 2004). A MFA, baseada na detecção de forças de superfície de atração e repulsão, é uma técnica poderosa que permite a observação e a manipulação de amostras biológicas em diferentes escalas (SANTOS; CASTANHO, 2004; CISNEROS ARMAS, 2007). A técnica do MFA é amplamente utilizada para a caracterização estrutural e topográfica de ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos e superfícies microbiológicas depositadas sobre substratos sólidos. Esta técnica fornece imagens em perspectiva 3D da ultraestrutura de superfícies com resolução molecular, em tempo real, sobre condições fisiológicas e com uma mínima preparação da amostra. O MFA é capaz de realizar medidas de força de interação entre superfícies fornecendo informações sobre as propriedades físicas do espécime, como: interações moleculares, hidrofobicidade, cargas e propriedades mecânicas das superfícies (DUFRÊNE, 2002; SANTOS; CASTANHO, 2004).

A visualização de biofilmes por MFA, como em microscopia eletrônica, além de fornecer informações sobre topografia de superfície com alta resolução e permitir que as imagens sejam rotacionadas e manipuladas, é vantajoso por não precisar de vácuo e de metalização, já que a amostra não precisa ser condutora (SURMAN *et al.*, 1996). A Microscopia de Força Atômica tem sido provada como uma potente ferramenta para caracterização qualitativa e quantitativa dos biofilmes, além de fornecer aspectos de interação entre o biofilme e o substrato e estudar componentes de superfícies bacterianos e proteínas que estejam envolvidas no desenvolvimento do biofilme (FANG *et al.*, 2000; BEECH *et al.*, 2002).

O padrão de superfície típico do esmalte dental bovino sem deposição de biofilme dental e polido conforme descrito no item 4.2, apresentou cristais de hidroxiapatita com tamanhos médios de 64,26 nm, como descrito na literatura (FARINA *et al.*, 1999). Comparando o padrão do esmalte livre de biofilme (Fig. 3A)

com os tratamentos onde o biofilme foi formado (Fig. 3B-H), foi observado que o padrão superficial é diferente, indicando que para cada tratamento determinado material foi depositado sobre o esmalte bovino. Em presença de biofilme são observadas estruturas maiores e a topologia da superfície é diferente daquela observada na ausência de biofilme (Fig. 3). Os resultados mostram que tanto em presença de carboidratos e/ou compostos nitrogenados as estruturas dos biofilmes dentais formados *in situ* são distintas.

**FIGURA 3 – IMAGEM TOPOGRÁFICA DOS BIOFILMES FORMADOS SOBRE OS BLOCOS DE ESMALTE EM DIFERENTES CONDIÇÕES**



As imagens foram obtidas por AFM operando em modo dinâmico e tratadas com o software SPM (Shimatzu). Uma imagem representativa das 8 regiões analisadas foi utilizada para visualização desta figura.

- A- Esmalte dental bovino
- B- Biofilme controle formado em presença de H<sub>2</sub>O destilada
- C- Biofilme formado em presença de cloreto de amônio 0,5 M
- D- Biofilme formado em presença de cloreto de amônio 0,5 M + sacarose 20%
- E- Biofilme formado em presença de sacarose 20%
- F- Biofilme formado em presença de cloreto de amônio 0,5 M + glucose 10% + frutose 10%
- G- Biofilme formado em presença de glucose 10% + frutose 10%
- H- Biofilme formado em presença de uréia 0,5 M



**TABELA 1 – TAMANHO DAS ESTRUTURAS E FORMAS ENCONTRADAS NOS BIOFILMES FORMADOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS**

<b>Condições experimentais</b>	<b>Formas</b>	<b>Dimensões (µm)</b>	
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	<b>Esferas</b>	<b>Diâmetro</b>	64,5 (26,1)
	<b>Filamentos</b>	<b>Comprimento</b>	99,2 (13,7)
		<b>Largura</b>	74,8 (21,1)
<b>Amônia</b>	<b>Esferas</b>	<b>Diâmetro</b>	75,4 (22,3)
<b>Amônia + sacarose</b>	<b>Esferas</b>	<b>Diâmetro</b>	117,1 (27,4)
	<b>Filamentos</b>	<b>Comprimento</b>	138,1 (17,8)
		<b>Largura</b>	89,3 (9,3)
<b>Sacarose</b>	<b>Esferas</b>	<b>Diâmetro</b>	82,3 (22,4)
<b>Amônia + glu + fru</b>	<b>Filamentos</b>	<b>Comprimento</b>	107,3 (20,6)
		<b>Largura</b>	80,1 (17,5)
<b>Glu + fru</b>	<b>Bastonetes</b>	<b>Maior</b>	129,9 (35,2)
		<b>Menor</b>	97,6 (11,1)
<b>Uréia</b>	<b>Filamentos</b>	<b>Largura</b>	71,7 (6,9)

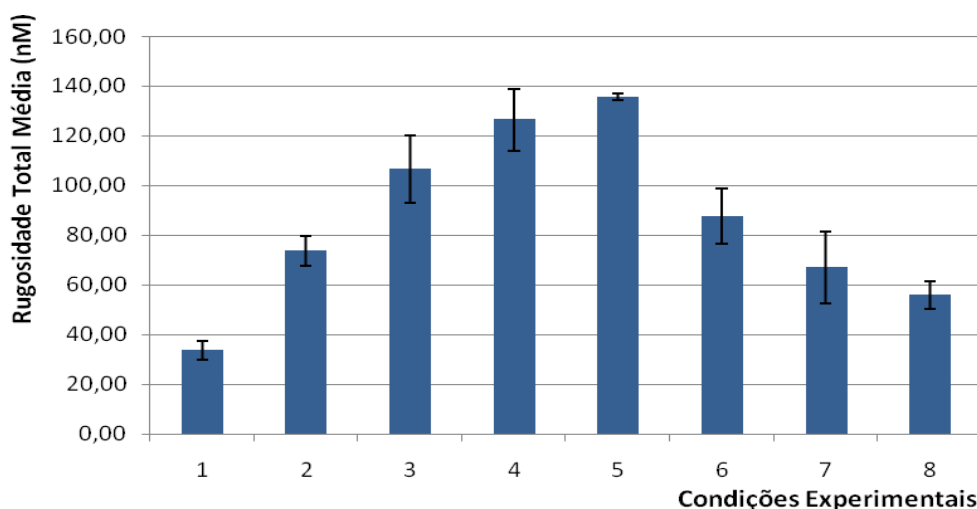
**FONTE:** O autor

As variações morfológicas observadas nas imagens em MFA estão resumidas na Tabela 1. Os tratamentos amônia e sacarose individualmente apresentaram morfologia e tamanhos de estrutura semelhantes, entretanto para os demais tratamentos foi observado uma variação de formas e tamanhos de estruturas, como por exemplo, os filamentos observados na presença de uréia são diferentes dos demais filamentos observados já que não conseguimos observar o início e o final da estrutura, sugerindo que este biofilme tem um aspecto de rede.

A figura 4 mostra o valor de rugosidade média obtido para as áreas analisadas. O menor valor de rugosidade foi observado no esmalte dental polido. Em presença dos biofilmes as rugosidades superficiais foram maiores. Nos biofilmes formados em presença de amônia associada ou não a sacarose ou sacarose isoladamente foram observados os maiores valores de rugosidade, sugerindo que estes filmes apresentam topologia irregular. Em presença de sacarose esperava-se que uma grande quantidade de biofilme fosse formada, devido à produção de polissacarídeos extracelulares que favorecem a adesão de microrganismos, o que

pode ter contribuído para aumentar a irregularidade dos biofilmes formados em presença de sacarose. Surpreendentemente, o biofilme formado em presença de amônia também apresentou altos valores de rugosidade, entretanto, os nossos resultados não nos permitem especular sobre quais seriam as razões deste achado.

**FIGURA 4 – RUGOSIDADE MÉDIA TOTAL DOS BIOFILMES FORMADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES.**



Os valores de rugosidade média total foram determinados através da análise das imagens com o Software SPM (Shimatzu). As condições experimentais foram: **1** – esmalte dental bovino sem biofilme, **2** – biofilme formado em presença de água destilada, **3** – biofilme formado em presença de amônia 0,5M, **4** – biofilme formado em presença de amônia 0,5M e sacarose 20%, **5** – biofilme formado em presença de sacarose 20%, **6** – biofilme formado em presença de amônia 0,5M, glucose 10% e frutose 10%, **7** – biofilme formado em presença de glucose 10% e frutose 10% e **8** – biofilme formado em presença de uréia 0,5 M. As análises foram realizadas em dois blocos de esmalte para cada tratamento. Em cada bloco de esmalte foram realizadas quatro medidas. O gráfico representa o valor médio destas medidas e as barras de desvio padrão das medidas.

A MFA, na pesquisa odontológica, já foi utilizada por inúmeros autores para comparar a superfície do esmalte de espécies animais distintas (FARINA *et al.*, 1998), para avaliar as superfícies do esmalte (HABELITZ *et al.*, 2001), dentina (KINNEY *et al.*, 1996; MARSHALL *et al.*, 1997) e cimento (SUNITA *et al.*, 2004) humanos, obter um padrão de formação da película dental adquirida formada em tempos (HANNIG, 1999) e superfícies (HANNIG *et al.*, 2001) diferentes e, até mesmo, analisar a correlação das ultra-estruturas presentes na parede celular do *S. mutans* e de estirpes mutantes e a formação do biofilme dental (CROSS *et al.*,

2006), assim como na interação *S. mutans* com biofilmes formados sobre compostos resinosos (BEYTH *et al.*, 2008).

## 5.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS PRESENTES NO BIOFILME DENTAL

A mudança na ecologia bucal, devido ao consumo elevado de carboidratos fermentáveis pela acidificação do meio ou pela falta de higiene bucal, acaba inibindo a maioria das espécies associadas com a saúde do esmalte dental e favorece o aumento de bactérias produtoras (acidogênicas) e tolerantes a ácido (acidúricas), tais como estreptococos do grupo Mutans e lactobacilos. Esta mudança perturba a homeostase microbiana e predispõe as superfícies dentárias à cárie dental (MARSH, 2003).

A previsão de risco a cárie tem sido de interesse em pesquisas há muito tempo; atualmente, o foco principal é a contagem dos microrganismos relacionados à etiologia das doenças devido à associação numérica positiva com lesões (VAN HOUTE, 1993). Meios seletivos favorecem a detecção de uma limitada fração da microbiota total cultivável. Na utilização de meios não-seletivos mostra-se claramente que a microbiota total da cárie radicular é muito mais complexa que aquela previamente encontrada em meios seletivos (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Entretanto, neste trabalho, focalizamos na contagem de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* por serem facilmente cultiváveis e por estarem diretamente relacionados a cárie dental.

Em contraste ao metabolismo de carboidratos que acidificam os biofilmes dentais, o metabolismo de nitrogênio produz moléculas de caráter básico, produzidas a partir da uréia salivar, peptídeos e aminoácidos, que podem fornecer um balanço na síntese de ácidos. A produção de álcalis no meio ambiente pode influenciar diretamente a competição bacteriana no biofilme dental, com relação à quantidade de microorganismos acidúricos potencialmente cariogênicos, e induzir mudanças no pH bucal (BOWDEN; LI, 1997). Inúmeros trabalhos na literatura correlacionam a presença de carboidratos fermentáveis na cavidade bucal, principalmente a sacarose, na elevação dos números absolutos de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* e o princípio de lesões cariosas (ELLEN; BANTING; FILLERY, 1985; BRADSHAW *et al.*, 1989, MARSH *et al.*, 1989, SISSONS *et al.*, 2007).

Estudos clínicos com pacientes portadores de doenças renais que apresentam altos níveis de composto nitrogenados na saliva e dietas ricas em carboidratos mostram que no grupo controle a quantidade de *Streptococcus mutans* corresponde a 40% do total de *Streptococcus* e em pacientes renais, essa quantia caiu para 1,3% (NOWAISER et al, 2003).

Neste trabalho, solução isolada de carboidratos fermentáveis (sacarose 20 %) ou associada (glucose 10% mais frutose 10%), comumente utilizadas na literatura, uma solução nitrogenada à base de cloreto de amônio 0,5 M, isolada, ou associada com carboidratos fermentáveis (cloreto de amônio 0,5 M mais sacarose 20%, cloreto de amônio 0,5 M mais glucose 10% mais frutose 10%) e uréia 0,5 M foram utilizadas para verificar quais seriam os efeitos destes compostos na quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* do biofilme dental formado *in situ*. Estes dois microrganismos foram escolhidos pela associação positiva com cárie dental.

As soluções de glucose e frutose, isoladas ou combinadas, foram utilizadas pela relação com a sua fermentação pelas bactérias orais e a manutenção do ambiente oral ácido. A solução de sacarose foi utilizada pela relação da sua presença com a produção de polissacarídeos extracelulares (PECs) que favorecem a adesão de *S. mutans* e outros organismos a superfícies dentais lisas (BOWDEN; LI, 1997). A sacarose é o substrato natural das glicosil e frutossiltransferase secretadas pelos *S. mutans*. Já as fontes de nitrogênio isolada ou combinadas com fontes de carboidratos foram usadas para simular o ambiente bucal de pacientes portadores de doenças renais crônicas.

O cultivo de *S. mutans* foi feito em meio seletivo MSA-bacitracina. Estes microrganismos, quando cultivados, são representados por colônias de halos azuis, elevadas e de margens irregulares. O meio Agar SL Rogosa, também conhecido como Agar RMW, é uma modificação do meio descrito por ROGOSA *et al.* (1951). Este meio é usado para isolamento, contagem e identificação de lactobacilos presentes na microbiota oral e intestinal, em fezes e em gêneros alimentícios. O baixo pH e a alta concentração de acetato, juntamente com baixas concentrações de manganês, magnésio e ferro, atuam como fatores de crescimento que permitem o crescimento ótimo destes microrganismos (aparecendo como colônias brancas, largas e uniformes) e favorecem a supressão de outras bactérias bucais (ROGOSA; MITCHELL; WISEMAN, 1951; TASCHDJIAN, 1953, 1957).

Os resultados são apresentados na tabela 2. Como a quantificação foi realizada em apenas uma amostra de biofilme para cada tratamento, não foi possível tratar os resultados estatisticamente. Entretanto, os resultados mostram que os biofilmes formados em diferentes condições apresentaram quantidade de *S. mutans* superiores a amostra controle. A quantidade de *Lactobacillus spp.*, somente em dois tratamentos (glucose 10% e frutose 10% e uréia 0,5M), foi inferior ao controle. Entretanto, como outras medidas não foram realizadas, não podemos considerá-los diferentes do controle. Apesar da limitação desta medida, é importante notar que tanto *S. mutans* quanto *Lactobacillus spp.* foram encontrados nas diferentes condições experimentais, sugerindo que estes microrganismos sobrevivem e podem adaptar-se a diferentes condições ambientais.

**TABELA 2 – DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE UFCS DE *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* NOS BIOFILMES FORMADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES**

<b>Condições Experimentais</b>	<b>UFC <i>S.mutans</i>/mg biofilme)</b>	<b>UFC <i>Lactobacillus spp.</i>/mg biofilme)</b>
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	2,1 x 10 <sup>6</sup>	7,8 x 10 <sup>2</sup>
<b>Amônia 0,5 M</b>	9,5 x 10 <sup>6</sup>	1,6 x 10 <sup>3</sup>
<b>Amônia 0,5 M + sacarose 20%</b>	6,2 x 10 <sup>8</sup>	2,4 x 10 <sup>3</sup>
<b>Sacarose 20%</b>	8,1 x 10 <sup>7</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>
<b>Amônia 0,5 M + glucose 10% + frutose 10%</b>	9,53 x 10 <sup>7</sup>	4,09 x 10 <sup>4</sup>
<b>Glucose 10% + frutose 10%</b>	1,94 x 10 <sup>8</sup>	3,1 x 10 <sup>2</sup>
<b>Uréia 0,5 M</b>	1,65 x 10 <sup>7</sup>	1,94 x 10 <sup>2</sup>

Neste trabalho, observamos que a quantidade de *S. mutans* foi maior que a de *Lactobacillus*, nas diferentes condições de formação de biofilme como descrito por BOYAR *et al.*, (1989) e MARSH *et al.*, (1989), em experimentos realizados *in vivo*. Entretanto, alguns autores, mostraram predominância de *Lactobacillus* em relação a *S. mutans* em biofilmes formados *in vivo* ou *in situ* (ELLEN *et al.*, 1985; PECHARSKI *et al.*;2003; TENUTA *et al.*;2006). Segundo, BOYAR *et al.*, (1989), a presença de *Lactobacillus* no biofilme dental formado *in vivo* estaria relacionada com fatores relacionados ao indivíduo.

Embora nossos dados não tenham sido estatisticamente analisados podemos observar que a quantidade de *S. mutans* não foi muito diferente entre os diferentes tratamentos, como observado por TENUTA *et al.*, (2008) em biofilmes formados em presença de água, glucose e frutose, e sacarose, em um modelo experimental semelhante ao utilizado neste trabalho. Estes autores sugerem que *in situ* a formação de polissacarídeos extracelulares não parece ser relevante para selecionar de *S. mutans* e *Lactobacillus* no biofilme dental. É conhecido que *in vivo* a presença de sacarose é importante para colonização das superfícies dentais lisas, entretanto, neste modelo experimental a utilização da rede protetora conferiria características retentivas à superfície dos blocos de esmalte.

Com relação à formação de biofilme dental em presença de glucose e frutose, Tenuta *et al.* (2006) observaram um aumento significativo na quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus*, quando comparado ao grupo controle (água destilada). Entretanto, nossos resultados mostraram que, apesar da contagem de *S. mutans* ser elevada, a quantidade *Lactobacillus spp* foi baixa.

Segundo KLEINBERG (2002), a relação entre os lactobacilos e a cárie dental em humanos não se apresenta como uma relação de causa e efeito. Os lactobacilos não seriam essenciais no biofilme dental ou para o desenvolvimento da cárie dental, já que as lesões cariosas poderiam se desenvolver na ausência de lactobacilos e, outros microorganismos acidogênicos, residentes na microbiota do biofilme dental, poderiam fornecer o ácido necessário para o início das lesões. A associação dos lactobacilos com a cárie dental, portanto, precisa ser avaliada com maior critério (KLEINBERG, 2002; SISSONS *et al.*, 2007).

Estudos clínicos realizados com pacientes portadores de deficiência renal crônica mostraram que o número de *S. mutans* no biofilme destes pacientes é menor do que no grupo controle e a quantidade de *Lactobacillus* é maior (BOWEN; TABAK, 1995). Neste trabalho observamos que nos tratamentos realizados em diferentes fontes de nitrogênio, a dosagem de *S. mutans* não foi inferior ao controle. Estes resultados podem sugerir que o modelo utilizado em indivíduo saudável não é capaz de reproduzir a condição ambiental de um paciente portador de doenças renais, já que esta doença tem implicações sistêmicas que não ocorrem em indivíduos saudáveis e que poderiam influenciar na composição do biofilme, como a mudança do perfil protéico salivar.

### 5.3 COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS DA MATRIZ INTRACELULAR DO BIOFILME FORMADO “*in situ*” SOBRE DIFERENTES CONDIÇÕES

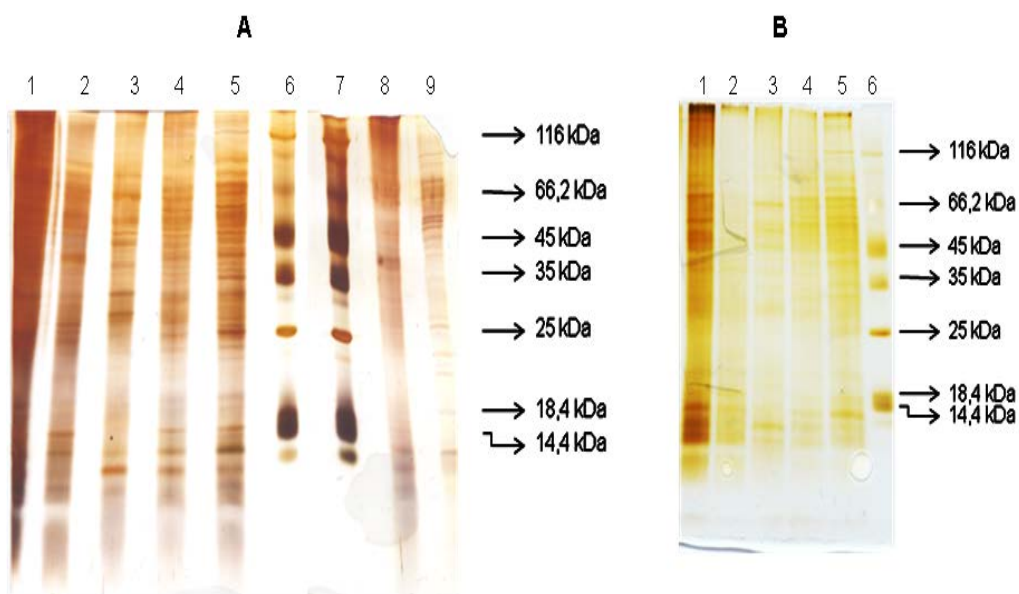
O biofilme formado sobre os blocos de esmalte foi coletado e as proteínas da matriz extracelular e intracelular foram extraídas. Entretanto, a concentração das proteínas da matriz extracelular foi muito baixa, impossibilitando a análise do perfil protéico. Assim, os resultados mostrados e discutidos serão os obtidos para a fração solúvel das proteínas presentes na matriz intracelular.

O perfil protéico dos biofilmes formados sobre diferentes condições experimentais foi analisado em eletroforese SDS-PAGE. Os resultados observados na figura 5 mostram que o perfil protéico dos biofilmes formados em diferentes condições é distinto daquele formado em presença da água e são diferentes entre si.

Na região de massa molecular menor ou igual a 18,4 kDa a resolução das bandas de proteína é maior e os perfis são heterogêneos, apesar do perfil de bandas ser semelhante nesta região durante os tratamentos água, glucose e frutose e uréia. A intensidade das bandas varia, sugerindo que dependendo da fonte nutricional disponível a síntese de algumas proteínas é inibida e outras estimuladas para que o metabolismo do biofilme adapte-se a condição ambiental. Na região de massa molecular maior que 18,4 até 25kDa a intensidade das bandas é fraca e a resolução fica comprometida. Entretanto, nos tratamentos amônia, glucose e frutose (Fig.5 A – linha 9) e uréia (Fig.5 A – linha 5) esta região apresenta bandas evidentes. Uma banda de aproximadamente 25kDa ( $R_f=0,61$ ) aparece nos tratamentos: amônia e sacarose (Fig 5 A – linha 2), uréia (Fig 5 A e 5B – linha 5) e amônia, glucose e frutose (Fig.5 A – linha 9) e a sua intensidade varia dependendo da condição experimental. Na região de proteínas de 25 até 35 kDa, observa-se uma banda de  $R_f$  0,65 no biofilme formado em presença de sacarose (Fig 5 A – linha 3) e outra de 0,68 em presença de sacarose e amônia (Fig 5 A – linha 2). Entre 35 e 45kDa, uma banda de  $R_f$  0,74 é observada nos biofilmes formados em presença de amônia e sacarose (Fig 5 A – linha 2, 5B – linha 2), glucose e frutose (Fig 5 A – linha 4), uréia (Fig. 5 A – linha 5) e água destilada (Fig. 5 A – linha 8). Na região de 45-66kDa, na maioria dos tratamentos, foi observado uma grande quantidade de bandas que dificulta a correta determinação dos  $R_f$ , com exceção dos tratamentos: sacarose (Fig. 5 A – linha 3) e água destilada (Fig. 5A – linha 8). Finalmente, na região de 66-

116kDa observa-se uma banda de Rf 0,89 nos tratamentos uréia (Fig 5A – linha 5) e sacarose (Fig 5 A – linha 3) e outra de Rf 0,92 nos tratamentos uréia (Fig. 5 A – linha 5) e amônia, glucose e frutose (Fig. A – linha 9). Estes resultados mostram que os biofilmes formados em diferentes condições apresentam perfil protéico característicos de cada tratamento, sugerindo que o metabolismo destes biofilmes é diferenciado.

**FIGURA 5** –PERFIL PROTÉICO DA MATRIZ INTRACELULAR DO BIOFILME DENTAL FORMADO EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS.



Os géis foram corados com nitrato de prata.

**Gel A:**

- Linha 1 - Biofilme formado em presença de amônia 0,5 M – 4µg
- Linha 2 - Biofilme formado em presença de amônia 0,5 M e sacarose 20% – 4µg
- Linha 3 - Biofilme formado em presença de sacarose 20% – 4 µg
- Linha 4 - Biofilme formado em presença de glucose 10% e frutose 10% – 4µg
- Linha 5 - Biofilme formado em presença de uréia 0,5M – 4µg
- Linha 6 - Marcador Fermentas (SM0431) - 2 µL
- Linha 7 - Marcador Fermentas (SM0431) - 2 µL
- Linha 8 - tratamento com H<sub>2</sub>O destilada – 1µg
- Linha 9 - tratamento com amônia 0,5 M + glucose 10% + frutose 10% – 1µg

**Gel B:**

- Linha 1 - Biofilme formado em presença de amônia 0,5 M – 4µg
- Linha 2 - Biofilme formado em presença de amônia 0,5 M e sacarose 20% – 4µg
- Linha 3 - Biofilme formado em presença de sacarose 20% – 4µg
- Linha 4 - Biofilme formado em presença de glucose 10% e frutose 10% – 4 µg
- Linha 5 - Biofilme formado em presença de uréia 0,5M – 4µg
- Linha 6 - Marcador Fermentas (SM0431) - 2 µL



Estes dados sugerem que dependendo da condição ambiental, a expressão gênica das proteínas sintetizadas pelos microrganismos orais e presentes na matriz intracelular do biofilme dental é regulada diferenciadamente. A diversidade metabólica das bactérias orais também pode ser indiretamente notada nas imagens topográficas dos biofilmes que foram distintas em cada condição experimental. Nestas imagens os perfis mais semelhantes foram dos biofilmes formados em presença de amônia e sacarose individualmente. Entretanto, o perfil protéico destes biofilmes não é semelhante, sugerindo que nem sempre mudanças a nível molecular podem ser claramente observadas a nível estrutural do biofilme.

Apesar da utilização deste modelo, provavelmente, não simular as condições bucais de um indivíduo com doença renal crônica, é possível visualizar e analisar a mudança do comportamento do biofilme devido às variações nutricionais do ambiente. Futuramente estes estudos poderão contribuir para entender os fatores que favorecem as alterações ecológicas do biofilme.

## 6. CONCLUSÕES

A introdução de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na cavidade bucal, usando o modelo de estudo “*in situ*”:

- interfere na estrutura do biofilme dental.
- altera em número e proporção de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* presentes nos biofilmes formados sobre as superfícies dentais;
- resulta na variação qualitativa e quantitativa do perfil de expressão protéica do biofilme dental, interferindo conseqüentemente na estrutura e composição protéica das bactérias do biofilme dental.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEN, E..A. Genetics of salivary protein polymorphisms. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.4, n° 3, p. 479-485, 1993.

BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R.S.; KILIAN, M.; TAGG, J.R. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. **J Med Microbiol**, v.51, n° 11, p.941–948, 2002.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers inBioscience**, v.9, p.1267-1277, 2004.

BAYRAKTAR, G.; KAZANCIOGLU, R.; BOZFAKIOUGLU, S. Evaluation of salivary parameters and dental status in adult hemodialysis patients. **Clin Nephrol** v.62, p.380-383, 2004.

BEECH, I.B.; SMITH, J.R.; STEELE, A.A.; PENEGAR, I.; CAMPBELL, S.A. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.23, n°2, p.231-247, 2002.

BEIGHTON, D. Stress and microbial diversity in the oral biofilm. **Interface Oral Health Science**, p.33–42, 2007.

BENEDETTO, M.S. **Proposta de um Método Prático para Avaliação do Poder de Neutralização Existente na Cavidade Oral**. 133f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BENELLI, E.M, SERRA, M.C., RODRIGUES, A.L. JR, CURY, J. A. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res**, v.27, p.280-284, 1993.

BEYTH, N.; BAHIR, R; MATALON, S, DOMB, A.J.; WEISS, E.I. *Streptococcus mutans* biofilm changes surface-topography of resin composites. **Dental materials**, vol. 24, p.732–736, 2008.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, n°2, p. 93 – 99, 1987.

BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; MEINDERS, J.M.; BUSSCHER, H.J. A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber: basic principles of the analysis. **J Microbiol Methods**, v.20, n°4, p.289–305, 1994.

BOTS, C. P.; POORTERMAN, J.H.G.; BRAND, H.S.; KALSBECK, H.; VAN AMERONGEN, B.M.; VEERMAN, E.C.I.; NIEUW AMERONGEN, A.V. The oral health status of dentate patients with chronic renal failure undergoing dialysis therapy. **Oral Diseases**, vol. 12, n° 2, p.176 – 180, 2006.

BOWDEN, G. H.; HAMILTON, I.R. 1987. Environmental pH as a factor in the competition between strains of the oral streptococci *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, and “*S. mitior*” growing in continuous culture. **Can J Microbiol**, 33:824–827, 1991.

BOWDEN, G.H.W., LI, Y.H. Nutritional influences on biofilm development. **Adv Dent Res**, v.11, n°1, p.81-99, 1997.

BOWDEN, G.H.W.; HAMILTON, I.R. Survival of oral bacteria. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.9, n°1, p. 54-85, 1998.

BOWEN, W.H; TABAK, L.A. **Cariologia para a década de 90**. São Paulo: Santos, 1995, p.249-260.

BOYAR, R.M.; THYLSTRUP, A.; HOLMEN, L.; BOWDEN, G.H. The microflora associated with the development of initial enamel decalcification below orthodontic bands in vivo in children living in a fluoridated-water area. **J Dent Res**, v.68, n°12, p.1735-1738, 1989.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

BRADSHAW, D.J.; MCKEE, A.S.; MARSH, P.D. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. **J Dent Res**, v.68, n°9, p.1298-1302, 1989.

BRADSHAW, D.J; MARSH, P. D.; KEITH WATSON, G.; ALLISON, C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. **Infect Immun**, v.66, n°10, p.4729–4732, 1998.

BURNE, R.A.; PARSONS, D.T.; MARQUIS, R.E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the genes of the arginine deiminase system of *Streptococcus sanguis* NCTC 10904. **Infection and Immunity**, v.57, n°11, p. 3540-3548, 1989.

CARLÉN, A. BORJESSON, A.C.; NIKDEL, K.; OLSSON, J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. **Caries Res**, v.32, p.447-455, 1998.

CARLÉN, A.; NIKDEL, K.; WENNERBERG, A.; HOLMBERG, K.; OLSSON, J. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. **Biomaterials**, v.22, n°5, p.481-487, 2001.

CARLÉN, A.; RUDIGER, S. G.; LOGGNER, I.; OLSSON, J. Bacterial-binding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite in vitro and on teeth in vivo. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, p.203-207, 2003.

CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res**, v.72, n°1, p.37-45, 1993.

CISNEROS ARMAS, D.A. **Molecular assemblies observed by atomic force microscopy**. 97 f. Dissertação (Doutorado em Física) – Technische Universität Dresden, Alemanha, 2007.

CLANCY, K.A.; PEARSON, S.; BOWEN, W.H.; BURNE, R.A. Characterization of Recombinant, ureolytic *Streptococcus mutans* demonstrates an inverse relationship between dental plaque ureolytic capacity and cariogenicity. **Infect Immun**, v.68, n°5, p.2621–2629, 2000.

COLBY, S.M.; MCLAUGHLIN, R.E.; FERRETTI, J.J.; RUSSELLI, R.R. Effect of inactivation of gtf genes on adherence of *Streptococcus downei*. **Oral Microbiol Immunol**, v.14, n°1, p.27–32, 1999.

COLBY, S.M.; RUSSELL, R.R.B. Sugar metabolism by mutans streptococci. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.83, p.80–88, 1997.

CORREIA, F.F.; DIRIENZO, J.M.; LAMONT, R.J.; ANDERMAN, C.; MCKAY, T.L., ROSAN, B. Insertional inactivation of binding determinants of *Streptococcus crista* CC5A using Tn916. **Oral Microbiol Immunol**, v.10, n°4, p.220-226, 1995.

CROSS, S.E.; KRETH, J.; ZHU, L.; QI, F.; PELLING, A.E.; WENYUAN, S.; GIMZEWSKI, J.K. Atomic force microscopy study of the structure–function relationships of the biofilm-forming bacterium *Streptococcus mutans*. **Nanotechnology**, v.17, p.1-7, 2006.

CROWLEY, P. J.; BRADDY, L. J.; MICHALEK, S. M. BLEIWEIS, A. S. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. **Infect. Immun.**, Washington, vol. 67, p. 1201-1206, 1999.

DASHPER, S.G.; REYNOLDS, E.C. pH regulation by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, v.71, n°5, p.1159-1165, 1992.

DEMUTH, D. R.; IRVINE, D.C.; COSTERTON, J.W.; COOK, G.S.; LAMONT, R.J. Discrete protein determinant directs the species-specific adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. **Infect Immun**, v.69, n°9, p.5736–5741., 2001.

DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J Dent Res**, v.67, n°6, p.890-895, 1988.

DICKINSON, M. E.; MANN, A. B. Nanomechanics and morphology of salivary pellicle. **J Mater Res**, v.21, n°8, p.1996-2002, 2006.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n°2, p.167–193, 2002.

DUFRÊNE, Y. F. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. **J Bacteriol**, v.184, n°19, p.5205–5213, 2002.

ELLEN, R.P.; BANTING, D.W.; FILLERY, E.D. *Streptococcus mutans* and Lactobacillus detection in the assessment of dental root surface caries risk. **J Dent Res**, v.64, n°10, p.1245-1249, 1985.

FANG, H.H.P.; CHAN, K.Y.; XU, L.C. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). **Journal of Microbiological Methods**, v.40, n°1, p.89-97, 2000.

FARINA, M.; SCHEMMEL, A.; WEISSMULLER, G.; CRUZ, R.; KACHAR, B.; BISCHT, P.M. Atomic force microscopy study of tooth surfaces. **Journal of Structural Biology**, v.125, n°1, p.39-49, 1999.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. A. M., **Cárie Dentária: A doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2005, p.29-48.

GARCÍA-GODOY, F.; HICKS, M. J. Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. **J Am Dent Assoc**, v.139, n°2, p.25-34, 2008.

GENCO, R. J.; GOLDMAN, H. M.; COHEN, D. W. **Periodontia contemporânea**. São Paulo: Santos, 1999, 117-125.

GIBBONS, R.J. Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases. **J Dent Res**, v.68, n°5, p.750-760, 1989.

GIBBONS, R.J.; VAN ROUTE, J. Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. **Infec Immun**, v.3, p.567-573, 1973.

HABELLITZ, S.; MARSHALL, S.J.; MARSHALL JR., G.W.; BALOOCH, M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. **Archives of Oral Biology**, v. 46, n°2, p.173-183, 2001.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J Dent Res**, v.63, n°3, p.407-411, 1984.

HANNIG, M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. **Clin Oral Invest**, v.3, n°2, p.88-95, 1999.

HANNIG, M.; HERZOG, S.; WILLIGEROTH, S.F.; ZIMEHL, R. Atomic force microscopy study of salivary pellicles formed on enamel and glass in vivo. **Colloid Polym Sci**, v.279, n°5, p.479-483, 2001.

HANNIG, M.; JOINER, A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. **Monogr Oral Sci Basel**, Karger, v.19, n°p.29-64, 2006.

HARA, A. T.; LUSSI, A.; ZERO, D. T. Biological Factors. **Monogr Oral Sci Basel**, Karger, 2006, v.20, p.88-99, 2006.

HAY, D. I.; BENNICK, A.; SCHLESINGER, D.H.; MINAGUCHI, K.; MADAPALLIMATTAM, G.; SCHLUCKEBIER, S.K. The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIFs and PIF-f). **Biochem J**, v.255, p.15–21, 1988.

HICKS J.; GARCÍA-GODOY, F.; DONLY K.; FLAITZ, C. Fluoride-releasing restorative materials and secondary caries. **Dent Clin North Am**, v.46, n°2, p.247-276, 2002.

JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in Microbiology**, v.13, n°12, p.589-595, 2005.

JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 8, n°2, p.175-200, 1997.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia bucal**. São Paulo: Santos, 1995.

KAUFMAN, E; LAMSTER, I. B. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. A review. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, n°7, p.453-465, 2000.

KINNEY, J.H.; BALOOCH, M.; MARSHALL, S.J.; MARSHALL JR, G.W.; WEIHS, T.P. Hardness and Young's Modulus of human peritubular and intertubular dentine. **Arch Oral Biol**, v. 41, n°9, p.9-13, 1996.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus Mutans* and the specific-plaque hypothesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n°2, p.108-125, 2002.

KOLENBRANDER, P. E; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol**, v.175, p.3247-3252, 1993a.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol**, v.54, p.413-437, 2000.

KOLENBRANDER, P.E.; ANDERSEN, R.N.; BLEHERT, P.G.; EGLAND, P.G.; FOSTER, J.S.; PALMER JR., R.J. Communication among oral bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, p.486-505, 2002.

KRETH J.; ZHU L.; MERRIT J.; SHI W.; QI F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol Immunol**, v.23, n°3, p.213–219, 2005.

KRETH, J.; ZHANG, Y; HERZBERG, M.C. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol**, v.190, n°13, p. 4632-4640, 2008.

KURAMITSU, H.K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n°2, p.159-176, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, p. 680-685, 1970.

LEMOES, J.A.C.; ABRANCHES, J.; BURNE, R.A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. **Curr Issues Mol Biol**, v.7, p.95-108, 2005.



LEN, A. C.; HARTY, D.W.; JACQUES, N. A. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. **Microbiology**, v.150, p.1353-66, 2004.

LI, T.; KHAH, M.K.; SLAVNIC, S., JOHANSSON, I.; STROMBERG, N. Different type 1 fimbrial genes and tropisms of commensal and potentially pathogenic *Actinomyces* spp. with different salivary acidic proline-rich protein and statherin ligand specificities. **Infection and Immunity**, v.69, n°12, p.7224-7233, 2001.

LI, J.; HELMERHORST, E.J.; LEONE, C.W.; TROXLER, R.F.; YASKELL, T.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; OPPENHEIM, F.G. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n°6, p.1311–1318, 2004.

LIJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. **Crit Ver Oral Biol Med**, v.7, n°2, p.180-198, 1996.

LINDHE, JAN. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005, p.23-40.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. **Microbiol Rev**, vol. 50, n°4, p. 353-380, 1986.

LUCAS, V.S.; ROBERTS, G.J. Oro-dental health in children with chronic renal failure and after renal transplantation: a clinical review. **Pediatr Nephrol**, v.20, p.1388–1394, 2005.

MARQUIS, R.E.; BENDER, G.R.; MURRAY, D.R.; WONG, A. Response of a *Streptococcus sanguis* strain to arginine-containing peptides. **Appl Environ Microbiol**, vol. 53, n°. 1, p. 687-692, 1987.

MARSH, P.D.; FEATHERSTONE, A.; MCKEE, A.S.; HALLSWORTH, A.S.; ROBINSON, C.; WEATHERELL, J.A.; NEWMAN, H.N.; PITTER, A.F.V. A microbiological study of early caries of approximal surfaces in schoolchildren. **J Dent Res**, v. 68, n°7, p. 1151-1154, 1989.

MARSH, P. D.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; COSTERTON, J. W. (Ed.). Dental plaque. *In*: **Bacterial Biofilms**. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. p.282.

MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Cariology**, Salisbury, v.43, n°4, p.599-614, 1999.

MARSH, P. D. Role of the oral microflora in health. **Microb Ecol Health Dis**, v.12, p.130–137, 2000.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? In **Microbiology**, v.149, p.279-294, 2003.

MARSH, P.D. Dental plaque as a biofilme and a microbial community –implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v.6, n°1, p.1-7, 2006.

MARSHALL, G.W.; MARSHALL, S.J.; KINNEY, J.H.; BALOOCH, M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**, v.25, n°6, p.441-458, 1997.

MOBLEY, C. C. Nutrition and dental caries. **Dent Clin North Am.**, v.47, n°2, p.319-336, 2003.

MUNRO, C. L.; GRAP, M.J. Oral Health and care in the intensive care unit: state of the science. **Am J Crit Care**, v.13, n°1, p.25-34, 2004.

NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. **Cerâmica**, v.44, n°290, 1998.

NIEUW AMERONGEN, A.V.; VEERMAN, E.C.I. Saliva – the defender of the oral cavity. **Oral Diseases**, v. 8, n°1, p.12-22, 2002.

NOWAISER, A.A.; ROBERTS, G.J.; TROMPETER, R.S.; WILSON, M.; LUCAS, V.S. Oral health in children with chronic renal failure. **Pediatr Nephrol**, v.18, n°1, p.39–45, 2003.

OOSHIMA, T.; KURAMITSU, H.K. Regulation of Extracellular Slime Production by *Actinomyces viscosus*. **Infection and Immunity**, v.32, n°3, p.1105-1112, 1981.

PAES LEME, A.F.; KOO, H.; BELLATO, C.M.; BEDI, G.; CURY, J.A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation — new insight. **J Dent Res**, v.85, n°10, p.878-887, 2006.

PELLAT, B.; MILLER, C.;GUEZ, D. Plaques bactériennes dentaires: approche biochimique. Potentiels cariogène et parodontopathogène. **Encyclopédie Médico-Chirurgicale**, v.23, p. 1-12.

PETERSON, S., WOODHEAD, J.; CRALL, J. Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. **Pediatr Res**, v. 19, p.796-799, 1985.

QI, F.;CHEN, P.; CAUFIELD, P.W. The Group I Strain of *Streptococcus mutans*, UA140, Produces Both the Lantibiotic Mutacin I and a Nonlantibiotic Bacteriocin, Mutacin IV. **Appli Environ Microbiol**, p. 15-21, v.67, n°1, 2001.

QUIVEY, R. G.; KUHNERT, W. L.; HAHN, K. Adaptation of oral streptococci to low pH. **Adv Microbiol Physiol**, v.42, p.239-274, 2000.

QUIVEY, R.G.; KUHNERT, W.L.; HAHN, K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. **Crit Rev in Oral Biol Med**, v.12, n°4, p.301-314, 2001.

ROETERS, F.J.M.; VAN DER HOEVEN, J.S.; BURGERSDIJK, R.C.W.; SCHAEKEN, M.J.M. Lactobacilli, Mutans Streptococci and dental caries: A longitudinal study in 2 year-old children up to the age of 5 years. **Caries Res**, v.29, p.272-279, 1995.

ROGERS, A.H.; ZILM, P.S.; GULLY, N.J.; PFENNIG, A.L. Response of a *Streptococcus sanguis* strain to arginine-containing peptides. **Infection and Immunity**, v.56, n°3, p.687-692, 1988.

ROGERS, J. D.; PALMER JR., R.J.; KOLENBRANDER, P.E.; SCANNAPIECO, F.A. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. **Infect Immun**, v.69, n°11, p.7046–7056, 2001.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J.A.; WISEMAN, R.F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. **J D Res**, v.30, n°5, p.682-689, 1951.

ROSAN, B; LAMONT, R.J. Dental plaque formation. **Microbes and Infection**, v.2, p. 1599-1607, 2000.

RUHL, S; SANDBERG, A.L; CISAR, J.O. Salivary receptors for the proline-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral Actinomyces and Streptococci. **J Dent Res**, v.83, n°6, p.505-510, 2004.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. **Biophysical Chemistry**, v.107, n°2, p.133–149, 2004.

SCANNAPIECO, F.A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.5, n°3, p.203-248, 1994.

SCHILLING, K.M.; BOWEN, W.H. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, v.60, n°1, p.284-295, 1992.

SHEMESH, M., TAM, A., FELDMAN, M.; STEINBERG, D. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *ftf*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. **Carbohydrate Research**, v.341, p.2090–2097, 2006.

SISSONS, C.H.; ANDERSON, S.A.; WONG, L.; COLEMAN, M.J.; WHITE, D.C. Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. **Caries Res**, v.41, p.413–422, 2007.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology**, v.28, n°1, p.12-55, 2002.

SOKURENKO, E.V.; CHESNOKOVA, V.; DYKHUIZEN, D.E.; OFEK, I.; WU, X.R.; KROGFELT, K.A.; STRUVE, C.; SCHEMBRI, M.A.; HASTY, D.L. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesion. **Proc Natl Acad Sci**, v.95, n°15, p.8922–8926, 1998.

SURMAN, S.B.; WALKER, J.T.; GODDARD, D.T.; MORTON, L.H.G.; KEEVIL, C.W.; WEAVER, W.; SKINNER, A.; HANSON, K.; CALDWELL, D.; KURTZ, J. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v.25, n°1, p.57-70, 1996.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v.147, n°p.3–9, 2001.

TAKAHASHI, Y.; KONISHI, K.; CISAR, J.O.; YOSHIKAWA, M. Identification and characterization of *hsa*, the gene encoding the sialic acid-binding adhesion of *Streptococcus gordonii* DL1. **Infect Immun**, v.70, n°3, p.1209–1218, 2002.

TAKEMOTO, T.; OZAKI, M.; SHIRAKAWA, M.; HINO, T.; OKAMOTO, H. Purification of arginine-sensitive hemagglutinin from *Fusobacterium nucleatum* and its role in coaggregation. **Journal of Periodontal Research**, v.28, n°1, p.1-28, 1993.

TANZER, J. M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A.M. The microbiology of primary dental caries in humans. **Journal of Dental Education**, v.65, n°10, p.1028-1037, 2001.

TASCHDJIAN, C.L. A simple prepared identification medium for *Candida albicans*. **Mycologia**, v.45, p.474, 1953.

TASCHDJIAN, C.L. Routine identification of *Candida albicans*: Current methods on a new medium. **Mycologia**, v.49, p.332, 1957.

TEN CATE, J. M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. **Odontology**, v.94, n°1, p.1-9, 2006.

TENUTA, L.M.A.; RICOMINI FILHO, A.P.; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Effect of sucrose on the selection of Mutans Streptococci and Lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Res**, v.40, n°6, p.546–549, 2006.

THOMAS, J.G.; NAKAIASHI, L.A. Managing the complexity of a dynamic biofilm. **J Am Dent Assoc**, v.137, n°3, p.10S-15S, 2006.

VAN HOOOGMOED, C.G.; DIJKSTRA, R.J.B.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Influence of biosurfactant on interactive forces between Mutans Streptococci and enamel measured by atomic force microscopy. **J. Dent. Res.**, vol. 85 (1), p. 54-58, 2006.

VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. **Adv Dent Res**, v.7, p.87-96, 1993.

WHITCHURCH, C.B.; EROVA, T.E.; EMERY, J.A.; SARGENT, J.L.; HARRIS, J.M.; SEMMLER, A.B.T.; YOUNG, M.D.; MATTICK, J.S.; WOZNIAK, D.J. Phosphorylation of the *Pseudomonas aeruginosa* response regulator AlgR is essential for type IV fimbria-mediated twitching motility. **J Bacteriol**, v.184, n°16, p.4544-4554, 2002.

WHITTAKER, C.J.; Klier, C.M.; KOLENBRANDER, P.E. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v.50, p.513–52, 1996.

WILKINS, J.C.; HOMER, K.A.; BEIGHTON, D. Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n°5, p.2382–2390, 2002.

WOOD, S.R.; KIRKHAM, J.; MARSH, P.D.; SHORE, R.C.; NALTRESS, B.; ROBINSON, C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. **J Dent Res**, v.79, n°1, p.21-27, 2000.

YAO, Y.; GROGAN, J.; ZEHNDER, M.; LENDENMANN, U.; NAM, B.; WU, Z.; COSTELLO, C. E.; OPPENHEIM, F.G. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. **Arch Oral Biol**, v.46, n°4, p.293-303, 2001.

YOSHIDA, Y.; PALMER, R.J.; YANG, J.; KOLENBRANDER, P.E.; CISAR, J.O. Streptococcal receptor polysaccharides: recognition molecules for oral biofilm formation. **BMC Oral Health**, v.6, n°1, p.S1-S12, 2006.

ZERO, D.T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, v.65, n°6, p.918-923, 1986.



